

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR-ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Bernard MAGNAN DE BORNIER

1^{re} THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE PHYSICOCHIMIQUE DE LA
FERRITINE ET DE L'APOFERRITINE. ROLE DU FER
DANS LA STRUCTURE DE LA FERRITINE
ET HYDRATATION DE L'APOFERRITINE

2^e THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 4 Décembre 1957 devant la Commission d'examen

M. WURMSER

Président

M. LEDERER

M. TONNELAT

{ *Examineurs*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen J. PERES

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
E. DARMOIS	T	Enseignement de Physique.
FOCH	T	Mécanique Physique et Expérimentale.
PAUTHENIER	T	Électrotechnique générale.
DE BROGLIE	T	Théories physiques.
JOB	T	Chimie générale.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.
GARNIER	T	Géométrie supérieure.
PERES	T	Mécanique des fluides et applications.
LAUGIER	T	Physiologie générale.
M. CURIE	T	Physique (P.C.B.).
BARRABE	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
G. DARMOIS	T	Calcul des probabilités et Physique Mathématiques.
J. BOURCART	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
PLANTEFOL	T	Botanique.
GRASSE	T	Évolution des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.
WYART	T	Minéralogie.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie végétale.
P. AUGER	T	Physique quantique et Relativité.
MONNIER	T	Physiologie des fonctions.
PIVETEAU	T	Géologie.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).
H. CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).
LAFFITTE	T	Chimie générale.
FAVARD	T	Mécanique générale.
COULOMB	T	Physique du Globe.
M ^{lle} COUSIN	T	Biologie animale (P.C.B.).
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
P. DRACH	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique.
EPHRUSSI	T	Génétique.
WURMSER	T	Biologie physico-chimique.
RIVIÈRE	T	Géologie (S.P.C.N.).
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.).
LUCAS	T	Recherches physiques.
A. THOMAS	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
M. MORAND	T	Physique.
SOLEILLET	T	Physique.
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.
DANJON	T	Astronomie.
FROMAGEOT	T	Chimie biologique.
LAPORTE	T	Physique générale et Radioactivité.
JANET	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.
PETIT	T	Biologie maritime.
QUENEY	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Embryologie.

EICHHORN	T	Biologie végétale (P.C.B.).
DE CUGNAC		Biologie végétale (P.C.B.).
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THELIER	T	Physique du Globe.
AUDUBERT	T	Électrochimie.
L'HÉRITIER	T	Génétique.
GRIVET	T	Radioélectricité.
PONCIN	T	Mécanique des fluides.
THIRY	T	Mécanique appliquée.
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
JUNG	T	Pétrographie.
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN	T	Chimie organique structurale.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste.
VASSY		Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES		Théories physiques.
M. PRUVOST	P	Géologie.
AMIEL	T	Chimie (P.C.B.).
HOCART	T	Minéralogie.
J.P. MATHIEU	T	Physique (P.C.B.).
COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.).
MAY	T	Biologie animale (P.C.B.).
CHOQUET	T	Calcul différentiel et intégral.
FELDMANN		Biologie (P.C.B.).
GUINIER	T	Physique (P.C.B.).
JOST	T	Biologie (P.C.B.).
FORTET	T	Calcul des probabilités.
SCHWARTZ	T	Méthodes mathématiques de la Physique.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviation.
BRELOT	T	Calcul différentiel.
NORMANT	T	Chimie (P.C.B.).
BENARD	T	Chimie (P.C.B.).
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).
DUGUE	T	Statistiques mathématiques.
GELOSO		Chimie (S.P.C.N.).
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiologie végétale.
MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD		Botanique.
DESTRIAU	T	Physique (M.P.C.).
Mlle LE BRETON ...		Physiologie générale.
SALEM	T	Mathématiques générales.
LELONG	T	Mathématiques générales.
DEVILLERS		Anatomie et Histologie comparées.
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FRANÇON		Physique (P.C.N.).
GLANCEAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
CODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.).
PISOT	T	Calcul des probabilités.
ROCH (E.)		Géologie.
SCHATZMANN		Astrophysique.

TERNIER	T	Paléontologie stratigraphique.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
JOLIOU	T	Physique nucléaire et Radioactivité.
LENNUIER		Physique (P.C.B.).
RIZET		Génétique.
M ^{me} TONNELAT		Théories physiques.
DIXIER		Mathématiques (M.P.C.).
SOUCHAY		Chimie (P.C.B.).
AIGRAIN		Physique (P.C.B.).
BRUSSET		Chimie (P.C.B.).
H. LÉVY		Physique théorique.
LENORMANT		Physiologie.
M ^{me} CHAIX		Chimie biologique.
M ^{me} HUBEL-PY		Biologie végétale (P.C.B.).
PIAUX		Chimie (P.C.B.).
BRUN		Mécanique expérimentale des fluides.
LEDERER		Chimie biologique.
M ^{me} DUBREIL-JACOTIN		Mathématiques.
M ^{me} LELONG-FERRAND		Mathématiques (E.N.S.).
BELLAIR		Géologie (S.P.C.N.).
COTTE	T	Physique (M.P.C.).
DUBOIS J.		Chimie.
LAMOTTE		Zoologie.
LE ROLLAND		Mécanique des fluides.
MICHEL		Chimie (P.C.B.).

Secrétaire général C. MONIER

AVANT-PROPOS

Ce travail m'a été proposé par M. BÉNÉZECH, Professeur à la Faculté de Médecine de Montpellier, et a été réalisé dans son laboratoire. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon attachement.

Je remercie vivement M. WURMSER, Professeur à la Sorbonne, qui, au cours de son parrainage au Centre National de la Recherche Scientifique, a toujours fait preuve à mon égard d'un intérêt bienveillant. En présidant le jury de ma thèse, dont il a bien voulu admettre l'orientation générale, il me manifeste une sollicitude qui est pour moi un encouragement précieux.

J'exprime également mes remerciements à M. le Professeur LEDERER, qui a accepté de juger ce travail, et plus particulièrement la partie biochimique, que j'ai eu le privilège de lui soumettre au cours de son passage à Montpellier, à l'occasion des IV^e Journées Biochimiques.

J'ai trouvé auprès de M. TONNELAT, Maître de Conférences, un accueil d'une grande amabilité. Les quelques conversations que j'ai pu avoir avec lui m'ont permis de préciser quelques points de mon exposé : je lui en exprime ma reconnaissance.

INTRODUCTION

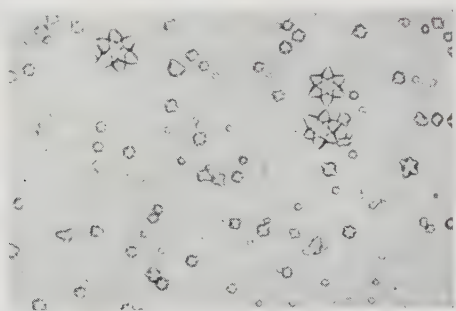
La ferritine est connue depuis les travaux de LAUFBERGER qui, en 1937, l'isola à partir de la rate et du foie de cheval. C'est une hétéroprotéine de couleur brun rouille intense, facilement cristallisable en présence de sulfate de cadmium à 5 p. 100 et de teneur en fer de l'ordre de 20 p. 100. C'est avec l'hémosidérine et la ferratine, isolée du foie de porc en 1894 par SCHMIEDEBERG, la seule protéine connue aussi riche en éléments minéraux (*).

MICHAELIS et GRANICK, à partir de mesures de susceptibilité magnétique, établissent que le fer de la ferritine se trouve essentiellement sous forme d'hydroxyde ferrique. En 1943, ces mêmes auteurs montrent qu'il est possible de libérer le fer de la ferritine sans dénaturer la partie protéique en le réduisant par l'hydrosulfite de sodium en présence d' α - α' -dipyridyle ou d'o-phénantroline. La copule protéique du fer, ainsi isolée, appelée *apoferritine*, se présente comme une holoprotéine incolore, donnant, en présence de sulfate de cadmium à 5 p. 100 des cristaux isomorphes des cristaux de ferritine.

A l'analyse, l'apoferritine se révèle, en particulier, exempte de phosphore alors que la ferritine en contient 1 p. 100 environ. D'où la notion que la totalité du phosphore de la ferritine est liée au fer. MICHAELIS et GRANICK considèrent la ferritine comme résultant de l'union d'une partie protéique et d'une partie minérale. Cette partie minérale, formée d'hydroxyde et de phosphate de fer, serait répartie dans les mailles du réseau protéique sous forme de petits granules ou micelles dont la composition serait : $(\text{FeOOH})_8(\text{FeOOPO}_3\text{H}_2)$. L'examen de la ferritine au microscope électronique confirme du

(*) Depuis le travail original de LAUFBERGER, différentes ferritines ont été extraites de nombreux animaux. Toutes contiennent 20 p. 100 environ de fer et sont cristallisables par le sulfate de cadmium : les cristaux appartiennent toujours au système cubique mais leur morphologie varie avec l'espèce animale d'origine.

reste cette hypothèse et permet de penser que ces micelles sont irrégulièrement disposées. (FARRANT, 1954). Remarquons que cette hypothèse ne préjuge en rien de la nature de la liaison unissant le complexe minéral à la protéine.



Microphotographie de cristaux de Ferritine

L'isomorphisme des cristaux de ferritine et d'apoferritine montre que le fer ou, plus exactement, le complexe minéral, ne joue aucun rôle dans la structure cristalline. MICHAELIS et GRANICK expliquent ce fait en admettant que la place, tenue dans les cristaux de ferritine par le complexe minéral, est occupée, dans les cristaux d'apoferritine, par de l'eau : l'analyse de ces derniers montre en effet qu'ils contiennent 45 p. 100 d'eau. Cependant, rien ne permet de dire qu'il s'agit d'eau de cristallisation : on peut tout aussi bien concevoir qu'il s'agit d'eau d'hydratation liée à la molécule d'apoferritine.

En somme, deux questions sont, entre autres, ainsi posées :

1^o Quelle est la nature de la liaison du fer et de la protéine et, par suite, quel rôle le fer joue-t-il dans la structure de la ferritine ?

2^o La molécule d'apoferritine est-elle hydratée et quelle sont les conséquences de cette hydratation éventuelle sur les propriétés physico-chimiques de l'apoferritine ?

Nous nous attacherons à répondre à ces questions au cours de ce travail.

Nous résumons, dans le tableau suivant, les principaux faits acquis concernant la ferritine et l'apoferritine de cheval.

	<i>Ferritine</i>	<i>Apoferritine</i>
Principaux éléments minéraux	Fer à l'état Fe +++ : 17 à 23 % Phosphore : 1 % en moyenne Eau : ?	Pas de fer ni de phosphore 45 % d'eau de cristallisation (Selon Michaelis).
Structure cristalline	Les cristaux appartiennent au système cubique et sont isotropes Chaque cristal est constitué par un cube dont chacune des 6 faces est surmontée d'une pyramide. Les diagrammes de diffraction des rayons X montrent que l'unité structurale des cristaux est un cube de 186 Å d'arête.	Mêmes caractères que les cristaux de ferritine.
Sédimentation -Ultracentrifugation.	Le diagramme d'ultra-centrifugation montre une nette hétérogénéité. (frontière diffuse).	Le diagramme d'ultra-centrifugation montre que l'apoferritine est homogène. $S_{20}^0 = 19,5$ unités svedberg. Coefficient d'asymétrie = 1,14.
Électrophorèse	Homogénéité électrophorétique (pic unique).	Homogénéité électrophorétique. Même mobilité que la ferritine.
Masse moléculaire	Ultracentrifugation — Diagramme de diffraction des rayons X : 545.000	Ultracentrifugation : 560.000 Diagramme de diffraction des rayons X : 460.000
Caractères de floculation par la chaleur	Par chauffage à une température inférieure à 80° C, la ferritine flocule réversiblement de ses solutions (elle repasse en solution par refroidissement). Si la température dépasse 80° C, la remise en solution n'est que partielle. Après chauffage à 100° C, la floculation est totalement irréversible.	L'apoferritine ne flocule de ses solutions qu'au dessus de 80° C (la température de floculation dépend de la concentration). La floculation n'est jamais réversible : elle est totale d'emblée.

Nous nous abstenons de commenter ici les résultats rassemblés dans ce tableau; nous en faisons état au cours de l'exposé de ce travail qui sera présenté de la façon suivante :

I. — PRÉPARATION ET PURIFICATION DE LA FERRITINE ET DE L'APOFERRITINE. COMPOSITION DU COMPLEXE MINÉRAL.

II. — LABILITÉ DU FER DE LA FERRITINE.

III. — HYDRATATION DE L'APOFERRITINE.

- a) *Stabilité des solutions de ferritine et d'apoferritine.*
- b) *Pression osmotique des solutions de ferritine et d'apoferritine.*
- c) *Viscosité des solutions de ferritine et d'apoferritine.*
- d) *Condition de déshydratation par la chaleur de la ferritine et de l'apoferritine.*

IV. — COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DE L'APOFERRITINE (ÉTUDE CHROMATOGRAPHIQUE) EN RAPPORT AVEC L'HYDRATATION DE LA MOLÉCULE.

V. — DISCUSSION ET CONCLUSION. DONNÉES SUR LA STRUCTURE DES DEUX PROTÉINES. RÔLE DU FER ET DE L'EAU DANS LA STRUCTURE SECONDAIRE.

Nous avons ajouté à ce travail une courte étude du comportement immunologique de la ferritine et de l'apoferritine à laquelle nous nous sommes référés pour préciser certains points de structure.

CHAPITRE PREMIER

PRÉPARATION ET PURIFICATION DE LA FERRITINE ET DE L'APOFERRITINE COMPOSITION DU COMPLEXE MINÉRAL

PRÉPARATION DE LA FERRITINE

La préparation de la ferritine à partir des tissus animaux et en particulier de la rôte de cheval qui en est la source la plus riche est basée, comme nous allons le préciser, d'une part sur la floculation réversible des solutions de ferritine par la chaleur (la température devant rester inférieure à 80°) et d'autre part, sur la propriété que possède la ferritine de cristalliser en présence de sulfate de cadmium à 5 p. 100. La technique opératoire décrite en premier lieu par LAUFBERGER [1], puis modifiée par MICHAELIS et GRANICK [7], est la suivante :

Le tissu est broyé, mélangé à un volume égal d'eau et laissé au repos durant 24 heures. Au bout de ce temps, on sépare par centrifugation une liqueur surnageante fortement colorée et qui contient la totalité de la ferritine. Cette liqueur est alors portée au bain-marie à 80°. A cette température, de nombreuses protéines floculent irréversiblement tandis que la ferritine, par refroidissement, repasse en solution. Par une nouvelle centrifugation on élimine le floculat. Le liquide surnageant est alors traité par le sulfate d'ammonium en quantité telle que la concentration finale soit égale à 30 p. 100. Le floculat obtenu est dissous dans la plus petite quantité d'eau possible. La ferritine peut alors être cristallisée par addition de sulfate de cadmium à raison de 5 g pour 100 ml de solution. Après une nuit de repos les cristaux sont séparés des eaux mères de cristallisation et redissous dans du sulfate d'ammonium à 2 p. 100. La cristallisation peut être recommencée plusieurs fois sans perte de ferritine.

PRÉPARATION DE L'APOFERRITINE

L'apoferritine ou fraction protéique de la ferritine peut être préparée par la méthode que nous allons décrire et qui est due à MICHAELIS et GRANICK.

15 ml d'une solution de ferritine à 3 p. 100 sont placés dans un sac de cellophane de 1 cm de diamètre ainsi que 100 mg d' α - α' -dipyridyle. Le sac de cellophane est suspendu dans un tube de verre étroit de 100 ml de capacité et contenant un tampon acide acétique-acétate de sodium de pH = 4,6 et de force ionique μ = 0,05. Un courant d'azote privé d'oxygène est amené bulle à bulle à travers la solution extérieure. Ensuite on ajoute, lorsque l'oxygène contenu dans la solution a suffisamment diminué, 100 mg d'hydrosulfite de sodium (dans la solution extérieure), le courant d'azote est continué toute la nuit. Le fer sous forme d'un complexe ferreux rose diffuse hors du sac que l'on dialyse contre de l'eau distillée jusqu'à ce que le liquide extérieur reste incolore. On ajoute alors à nouveau 100 mg d' α - α' -dipyridyle et l'on répète l'opération précédente. Peu à peu la coloration initiale brun rouille intense devient brun pâle puis disparaît. A partir de la solution incolore on peut obtenir des cristaux d'apoferritine exempts de fer par addition de sulfate de cadmium. On peut soumettre à nouveau au même traitement par l' α - α' -dipyridyle. Parfois la solution finale, après dialyse, reste légèrement colorée en jaune pâle, ce qui est dû à une décomposition du dipyridyle lorsque la réaction du milieu n'est pas assez acide. Une nouvelle cristallisation suffit généralement pour faire disparaître cette coloration.

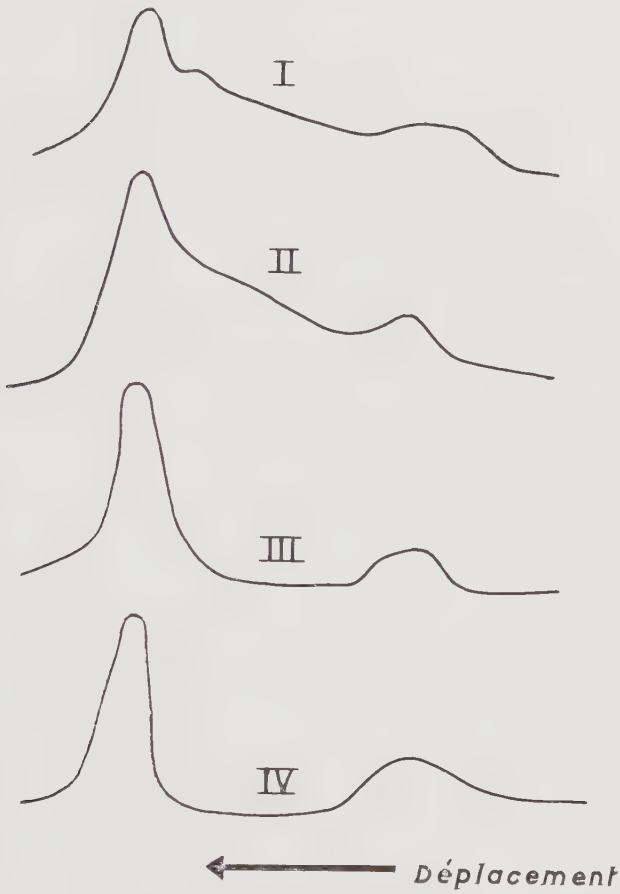


Fig. 1. — Diagrammes d'électrophorèse de ferritine à différents stades de la préparation.

Courbe I	: 1 cristallisation	par le sulfate de cadmium	
Courbe II	: 2 cristallisations	—	—
Courbe III	: 3	—	—
Courbe IV	: 6	—	—

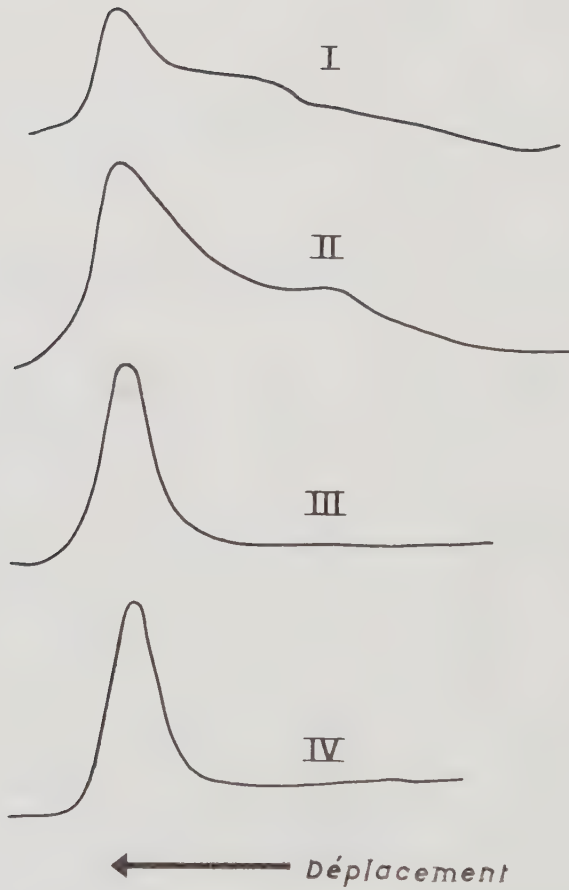


Fig. 2. — Diagrammes d'électrophorèse de préparations de ferritine à divers stades.

Courbe I : 1 cristallisation suivie d'une dialyse.

Courbe II : 2 cristallisations suivies d'une dialyse.

Courbe III : 2 — — —

Courbe IV : 6 — — —

Nous avons, dans un certain nombre de cas, préparé l'apoferritine selon une technique un peu différente, qui a l'avantage d'être plus rapide et de fournir, en une seule fois, une quantité plus importante d'apoferritine.

On introduit dans un bécher 40 à 50 ml d'une solution de ferritine à 3 p. 100 et 4 à 5 ml d'un tampon acétate de pH = 4,6 (la force ionique finale étant égale à 0,05), 250 mg de dipyridyle et enfin 150 mg d'hydrosulfite de sodium. Après agitation on laisse reposer pendant 2 heures et l'on traite directement, sans dialyse préalable, la solution par du sulfate de cadmium (concentration terminale : 5 p. 100). Les cristaux obtenus sont séparés par centrifugation et dissous dans $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ à 2 p.100.

L'opération est recommencée en ajoutant 100 mg de dipyridyle seulement. Les cristaux obtenus par addition de SO_4Cd ne contiennent plus de fer. Cette méthode permet d'obtenir rapidement 500 à 600 mg d'apoferritine.

CRITÈRE DE PURETÉ DES SOLUTIONS DE FERRITINE ET D'APOFERRITINE

Nous avons contrôlé la pureté de nos préparations de ferritine et d'apoferritine au moyen de l'électrophorèse sur papier (Tampon véronal de Durum pH = 8,6). Nous avons pu constater que la ferritine peut être considérée comme pure, tout au moins du point de vue électrophorétique, après trois cristallisations par le sulfate de cadmium suivies d'une dialyse prolongée contre de l'eau distillée. Ceci ressort du reste assez nettement des diagrammes des figures 1 et 2 qui montrent que :

a) Même après un nombre important (5 à 6) de cristallisations non suivies de dialyse, l'homogénéité électrophorétique n'est pas réalisée. En particulier après 6 cristallisations on note l'existence de deux clochers, l'un, assez élevé, correspond à la ferritine, l'autre, moins important, correspond à des impuretés.

b) Si après un nombre variable de cristallisations par le sulfate de cadmium on réalise une dialyse prolongée (qui a pour effet d'entraîner la floculation irréversible d'une substance protéique mal définie et contenant du fer), on observe que pour un nombre de cristallisations égal ou supérieur à 3 les diagrammes d'électrophorèse ne comportent qu'un seul « pic » bien défini.

c) En ce qui concerne l'apoferritine, qu'elle soit préparée selon la technique de MICHAELIS et GRANICK ou selon la variante que nous avons indiquée, on observe un pic électrophorétique unique. Les diagrammes de la fig. 3 montrent, de plus, que les migrations électrophorétiques de la ferritine et de l'apoferritine sont identiques.

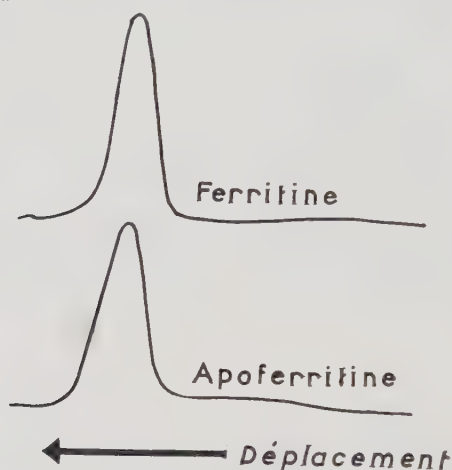


Fig. 3. — Diagrammes d'électrophorèse de solutions de ferritine et d'apoferritine montrant l'homogénéité de l'apoferritine et l'identité des mobilités de ces deux protéines. (Copies d'enregistrements réalisés avec le photomètre de LERÈS).

CONSTITUTION ÉLÉMENTAIRE DE LA FERRITINE TENEUR EN FER

A partir de solution de ferritine électrophorétiquement pure, nous avons cherché à déterminer les proportions de ses principaux constituants c'est-à-dire, essentiellement, l'azote protéique, le fer et le phosphore que nous avons dosés respectivement par les méthodes de KJELDALL, WONG et MACHEBŒUF. Les résultats obtenus pour trois des échantillons que nous avons étudiés, exprimés en p. 100 de la masse du résidu sec, sont contenus dans le tableau suivant :

TABEAU I

	<i>Fer</i>	<i>Azote</i>	<i>Phosph.</i>	<i>Fer</i> <i>Azote</i>	<i>Fer</i> <i>Phosph.</i>	<i>Azote</i> <i>Phosph.</i>
	23	9,7	0,83	2,47	25,3	11,7
	21	9,6	1,41	2,16	16,3	6,8
	17,5	10,1	1,19	1,73	14,5	9
Moyenne	20,5	9,85	1,14	2,12	18,7	9,17

Ces résultats, si partiels soient-ils, nous montrent que la ferritine n'a pas une constitution bien définie, mais au contraire que sa constitution varie d'une préparation à une autre. Cependant, en dépit de cette inconstance, nous voyons que la teneur en fer reste voisine de 20 p. 100 avec un rapport Fe/N sensiblement constant (peu différent de 2). Par contre la teneur en phosphore est beaucoup plus variable. Les rapports Fe/P et N/P sont très inconstants : ce qui montre bien qu'il n'y a de relation définie ni entre le fer et le phosphore, ni entre l'azote et le phosphore. Or, comme nous l'avons déjà indiqué, le phosphore appartient en totalité au complexe minéral puisque l'apoferritine est exempte de phosphore. Il apparaît donc que la formule proposée par MICHAELIS et GRANICK : $(\text{Fe OO PO}_3 \text{ H}_2) (\text{Fe OO H})_8$ qui implique une relation définie entre le phosphore et le fer (1 atome de phosphore pour 9 atomes de fer), n'est pas en accord avec les valeurs inconstantes que nous avons trouvées pour le rapport Fe/P. C'est pourquoi il nous a semblé intéressant de préciser la constitution du complexe minéral de la ferritine.

ÉTUDE DU COMPLEXE MINÉRAL DE LA FERRITINE

Nous savons depuis les travaux de GRANICK et HAHN [15] qu'il est possible de séparer de son support protéique le complexe minéral de la ferritine en traitant cette protéine par la soude de la façon suivante : à un volume donné d'une solution de ferritine est ajouté un volume égal de soude normale. Après 10 minutes de contact à la température de 20° le flocculat brun-rouille obtenu est séparé par centrifugation puis dialysé contre de l'eau distillée et enfin séché à l'étuve. La composition de ce flocculat est trouvée égale à (selon GRANICK et HAHN) :

C	8,39 %
H	1,99 %
N	2,04 %
P	0,90 %
S	0,06 %
Fe	65,49 %
Cd	2,16 %

Deux remarques s'imposent :

1° L'azote contenu dans le flocculat représente une fraction (10 p. 100) de la protéine qui a accompagné le fer dans sa floculation.

2° Le phosphore du flocculat ne représente que le 1/4 environ du phosphore total (le rapport Fer/Phosphore est égal à 72 au lieu d'une valeur moyenne de 18 à 19 ainsi que nous l'avons vu). Ce fait peut s'interpréter d'au moins deux façons : ou bien la totalité du phosphore n'est pas liée au fer ou bien l'action de la soude ou la dialyse provoque la rupture des 3/4 environ des liaisons fer-phosphates.

Si bien que l'analyse du flocculat ainsi obtenu ne donne pratiquement aucun renseignement sur la structure du complexe minéral de la ferritine. C'est pourquoi nous nous sommes attachés à rechercher s'il n'est pas possible d'isoler réellement le complexe minéral de la ferritine sans qu'il perde certains de ses éléments (phosphore) ou qu'il soit souillé par des substances étrangères (protéines).

I. — ACTION DE LA SOUDE NORMALE SUR LA FERRITINE

Si l'on met en contact pendant dix minutes à la température de 20° C des volumes égaux d'une solution de ferritine (contenant 0,35 mg d'azote et 0,9 mg de fer par ml) et d'une solution de soude normale, il se forme un flocculat brun rouille que l'on peut facilement séparer, par centrifugation, d'un liquide surnageant incolore. On peut alors faire les constatations suivantes :

a) La solution surnageante ne contient plus en moyenne que 0,335 mg d'azote par ml, ce qui signifie que 5 p. 100 de la protéine initiale accompagnent le fer dans sa floculation.

b) La fraction protéique du flocculat peut être remise en solution de la façon suivante : le flocculat est repris par 5 ml d'eau, agité et centrifugé; le liquide de lavage est conservé. Cette opération est répétée cinq fois de suite. On note alors que :

— Les solutions de lavages 1,4 et 5 sont incolores et ne contiennent pas d'azote.

— Les solutions de lavages 2 et 3 que l'on réunit ont, au contraire, la coloration jaune pâle des solutions diluées de ferritine. Cette solution contient du fer et pratiquement tout l'azote qui avait floculé.

Le rapport Fer/Azote est égal à 1,7. L'étude électrophorétique de la substance en solution montre une migration nulle. Il semble donc que la fraction protéique du flocculat soit de la ferritine partiellement dénaturée, capable de passer à nouveau en solution lorsque l'alcalinité du milieu diminue suffisamment (à partir du deuxième lavage seulement).

Il est par suite possible qu'en traitant la ferritine par de la soude moins concentrée, aucune fraction protéique n'accompagne le complexe ferrique dans sa floculation. Nous avons donc cherché à préciser l'action de la soude à concentrations variables sur la ferritine.

II. — ACTION DE LA SOUDE A CONCENTRATIONS VARIABLES SUR LA FERRITINE

Dans une série de tubes à essais, on met en contact pendant une heure à 37° des volumes égaux de la solution de ferritine précédemment utilisée et de soude de titre x . Lorsque x est inférieur ou égal à 0,1 N la solution reste limpide. Pour $x = 0,12$ N on note un léger trouble. Par

centrifugation on sépare un résidu brun peu important, la solution surnageante reste fortement colorée. Pour $x = 0,16$ N le trouble est plus important que pour 0,12 N. La solution surnageante, après centrifugation, est moins colorée. Lorsque x est égal ou supérieur à 0,2 N (et jusqu'à 0,5 N) on observe un floculat abondant et la solution séparée par centrifugation est alors incolore.

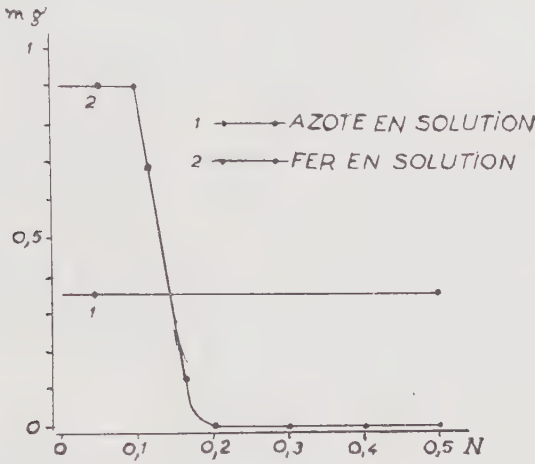


Fig. 4. — Action de la soude de titre variable sur la ferritine, après 1 heure de contact à 37° C.

Courbe 1 : Fer restant en solution.

Courbe 2 : Azote restant en solution.

Les dosages de fer et d'azote effectués après centrifugation dans les solutions surnageantes donnent les résultats ci-après, exprimés en mg par ml de la solution de ferritine initiale (Tableau II).

Ces résultats sont représentés par le graphique 4, obtenu en portant en abscisses les titres des solutions de soude utilisées et en ordonnées les teneurs en fer et en azote des solutions surnageantes.

TABLEAU II

<i>Titre de la soude</i>	<i>Fer en solution</i>	<i>Azote en solution</i>	<i>Fer Floculé</i>	<i>Azote Floculé</i>
0,05 N	0,90 mg/ml	0,35 mg/ml	0 mg/ml	0 mg/ml
0,10 N	0,90	«	0	«
0,12 N	0,68	«	0,22	«
0,16 N	0,13	«	0,77	«
0,2 N	0,02	«	0,88	«
0,3 N	0	«	0,90	«
0,4 N	0	«	0,90	«
0,5 N	0	«	0,90	«

Nous voyons, donc d'après ces résultats, que la floculation totale du fer peut être réalisée pour une concentration (soude 0,2 N) bien inférieure à celle (soude N) utilisée par GRANICK, et que, dans ces conditions, l'azote protéique reste en totalité soluble. On peut donc éviter qu'une fraction protéique soit entraînée dans sa floculation par le complexe minéral, à condition d'utiliser de la soude telle que la concentration finale du milieu de réaction soit comprise entre 0,15 et 0,25 N par exemple.

III. — COMPOSITION DU FLOCULAT

La floculation du complexe minéral étant réalisée par la soude 0,2 N dans les conditions précédemment fixées, le floculat est séparé par centrifugation puis lavé à deux reprises par de la soude de même concentration.

Le fer, le phosphore et l'azote sont alors dosés dans le floculat et dans la liqueur séparée par centrifugation additionnée des solutions de lavage du floculat. Les résultats obtenus, relatifs à quelques échantillons de ferritine, sont portés sur le tableau suivant :

TABLEAU III

<i>Rapport Fe/N des différents échantillons</i>	<i>Floculat</i>				<i>Liqueur surnageante</i>		
	Fe	P	N	Fe/P	Fe	N	P
1,93	2,8	0,10	0	28	0	1,45	0
1,80	2,3	0,086	0	26,7	0	1,27	0
1,72	1,08	0,09	0	12	0	0,63	0
1,90	5,6	0,35	0	16	0	2,94	0
2,12	11,2	0,40	0	28	0	5,28	0
1,76	11,2	0,45	0	22,6	0	6,36	0
1,84	1,2	0,09	0	13,3	0	0,65	0
2,0	9	0,72	0	12,5	0	4,5	0

Il apparaît donc assez nettement que :

1° La totalité du phosphore de la ferritine est liée au fer et rentre dans la composition du complexe minéral. Le fait que GRANICK n'ait, dans son travail, retrouvé que le 1/4 environ du phosphore présent dans la ferritine semble provenir d'une élimination des phosphates au cours de la dialyse à laquelle cet auteur avait soumis le floculat.

2° Le rapport Fer/Phosphore, loin d'être constant, oscille entre deux valeurs extrêmes que nous avons trouvées égales à 12 et 28. Ce

rapport pondéral signifie que le nombre des atomes de fer par atome de phosphore oscille entre des chiffres extrêmes qui sont sensiblement 6 et 15.

Cela revient à dire que la formule proposée par GRANICK pour les « micelles » d'hydroxyde — phosphate de fer représente leur composition *moyenne* (1 atome de phosphore pour 9 atomes de fer) mais n'est certainement pas valable dans la majorité des cas. Il nous paraît plus conforme à la réalité d'écrire :



avec $5 < n < 14$.

CHAPITRE II

LABILITÉ DU FER DE LA FERRITINE

Ainsi que nous l'avons déjà indiqué, le fer de la ferritine est à l'état trivalent à l'exception toutefois, ainsi que l'ont montré MAZUR, BAEZ et SHORR [34], d'une faible quantité de fer bivalent qui représente de 0.25 à 1 pour 1.000 du fer total. Le fer trivalent de la ferritine, masqué à ses réactifs habituels, peut cependant être facilement mis en évidence : il suffit pour cela d'ajouter à une solution de ferritine un peu de sulfo-cyanure d'ammonium et d'acide sulfurique dilué pour voir apparaître *progressivement* et s'intensifier la coloration rouge caractéristique du fer ferrique. Par contre, il est beaucoup plus difficile d'apprécier la nature de la liaison qui unit le fer à la fraction protéique. Différentes hypothèses ont été jusqu'ici proposées :

Pour KUHN, SORENSEN et BIRKOFER [4], à chacune des liaisons peptidiques $-CO-NH-$ serait fixé un atome de fer. D'après ces auteurs en effet, une molécule de ferritine comporterait 281 liaisons peptidiques (chiffre voisin de 288 indiqué par la théorie des cyclols) et un nombre sensiblement égal (235) d'atomes de fer. L'écart existant entre ces deux nombres (281 et 235) étant interprété par la non saturation de la ferritine en fer. Cette théorie n'est généralement pas retenue, ne serait-ce qu'en raison de ce que, d'une part, la théorie de WRINCH n'est plus guère admise et d'autre part, de ce que la matériel expérimental de KUHN contenait 12,1 p. 100 d'acides nucléiques, ce qui signe son impureté puisque l'on sait, depuis les travaux de GRANICK et MICHAELIS [18], qu'il n'y a pas d'acides nucléiques dans la ferritine.

GRANICK et MICHAELIS, se basant, d'une part sur l'étude du moment magnétique de la ferritine (qui indique l'existence d'hydroxyde de fer), et, d'autre part, sur la teneur en phosphore qui est de 1 p. 100 environ (ainsi que nous l'avons vu au chapitre précédent) pour la ferritine et nulle pour l'apoferritine, pensent que le fer est réparti dans la ferritine sous forme de granules d'hydroxyde et de phosphate de fer pour lesquels ils proposent la formule $(FeOOH)_8 (Fe OPO_3 H_2)$ que nous avons discutée précédemment. Cette hypothèse, généralement admise, est du reste confirmée par une étude de FARRANT [33] qui, au moyen du

microscope électronique, montre qu'il existe dans la ferritine des granules inégalement distants les uns des autres, de diamètre égal à 55 Å et formés de quatre sous unités de 27 Å que l'on peut assimiler aux micelles d'hydroxyde-phosphate de fer.

Remarquons que l'étude des spectres de diffraction des rayons X réalisée par FRANCKUCHEN [12] et qui montre pour la ferritine et l'apoferritine des diagrammes identiques peut aussi bien s'interpréter par l'hypothèse de KUHN que par celle de GRANICK.

Cependant, l'hypothèse de GRANICK et MICHAELIS ne précise pas la nature de la liaison fer-protéine ni l'emplacement du fer par rapport à la protéine. Pour tenter de répondre à ces questions nous nous sommes attachés à préciser les différents mécanismes suivants lesquels le fer peut être arraché à la ferritine ainsi que les modifications structurales résultant de l'action des différents agents susceptibles de provoquer la mobilisation du fer (dénaturation éventuelle).

Au cours de cette étude, nous avons dû fréquemment doser le fer en présence de ferritine ce qui comporte une difficulté de principe car la méthode colorimétrique habituelle utilise des réactifs dont l'acidité entraîne précisément la libération du fer de la ferritine.

Nous indiquerons tout d'abord comment, après divers tâtonnements, nous avons adopté un mode expérimental relativement simple et rapide.

REMARQUE PRÉLIMINAIRE :

DOSAGE DU FER EN PRÉSENCE DE FERRITINE

Il n'est pas possible de doser, dans les conditions habituelles (dosage colorimétrique par la méthode au sulfocyanure d'ammonium en milieu sulfurique), le fer en présence de ferritine en raison, d'une part, de la forte coloration de la ferritine et, d'autre part, de l'acidité des réactifs qui est capable de libérer une certaine quantité de fer. C'est pourquoi nous avons cherché les conditions dans lesquelles ce dosage peut être réalisé.

Il était logique de penser tout d'abord à éliminer la ferritine du milieu de réaction. Pour cela nous avons essayé la floculation par la chaleur, la précipitation par le sulfate d'ammonium saturé, à froid et à chaud, la floculation par l'acétone. Notre mode expérimental était le suivant :

1 ml d'une solution de ferritine contenant 5 mg de ferritine est additionné de 1 ml de solution ferrique (contenant 0,1 mg de fer) acidifiée par de l'acide acétique de façon à réaliser un pH de l'ordre de 3,5 suffisamment élevé pour ne pas libérer le fer à partir de la ferritine, et ne pas entraîner la floculation de la protéine.

Ce mélange est introduit dans trois tubes à essais : 1, 2, 3.

— Le tube 1 est porté à l'ébullition jusqu'à floculation complète; il se forme des flocons brun-rouille surmontés d'un liquide incolore ou légèrement jaunâtre.

— Le tube 2 est additionné de 15 ml de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ en solution saturée et de cristaux de sulfate d'ammonium de sorte que l'ensemble soit saturé: la précipitation est totale.

— Le tube 3 est additionné de 15 ml d'acétone, ce qui entraîne rapidement une floculation complète.

Les trois tubes sont centrifugés et on dose le fer dans le liquide surnageant; les résultats obtenus sont les suivants :

TABLEAU IV

<i>Procédé de floculation</i>	<i>Tube 1 Chaleur</i>	<i>Tube 2 SO₄ (NH₄)₂</i>	<i>Tube 3 Acétone</i>
Fer dosé dans la solution			
a) en mg	0,043	0,020	0
b) en p. 100 du fer ajouté	43	20	0

Les données numériques ci-dessus représentent des valeurs moyennes et montrent clairement que la ferritine entraîne dans sa floculation tout ou partie du fer.

Nous avons donc essayé de traiter ces différents floculats par diverses solutions afin de récupérer le fer retenu, vraisemblablement par adsorption.

— Le floculat du tube 1, obtenu par la chaleur a été traité par de l'acide sulfurique 0,01 N, acidité insuffisante pour libérer le fer inclus dans la ferritine.

— Le floculat du tube 2, obtenu par saturation au sulfate d'ammonium, a été traité par une solution saturée de sulfate d'ammonium.

— Le floculat du tube 3, obtenu par l'acétone, a été traité par une solution d'acétone chlorydrique 0,01 N.

Dans les trois cas nous avons donc ajouté un éluant respectant les conditions de floculation de façon à éviter en particulier la redissolution de la protéine. Les résultats n'ont guère été satisfaisants, nous les indiquons ci-dessous :

TABLEAU V

<i>Solution éluante</i>	<i>SO₄H₂ 0,01 N</i>	<i>SO₄(NH₄)₂</i>	<i>Acétone</i>
Fer dosé exprimé en p. 100 du fer ajouté.	50	34	20

Non seulement les résultats obtenus ne sont pas quantitatifs et, par conséquent, ne peuvent être retenus, mais nous les avons trouvés

très inconstants de sorte que, pratiquement, il ne paraît pas possible de doser du fer libre en présence de ferritine par floculation de la protéine, le fer libre étant en partie retenu par le flocculat et l'élution se faisant dans des conditions inconstantes.

Nous avons cherché à doser le fer libre en présence de ferritine en réalisant la réaction colorée au sulfocyanure dans des conditions expérimentales telles que les réactifs ne puissent entraîner une libération appréciable du fer contenu dans la protéine. Les principaux résultats de cette étude sont exposés dans les paragraphes suivants.

Il nous est apparu, et nous préciserons ce point plus loin, qu'à la température de 20° C, une solution de ferritine en milieu sulfurique de concentration 0,01 N ne libérait pas son fer et que, par ailleurs, cette acidité suffit au développement de la coloration rouge du complexe sulfocyanure ferrique.

Cependant, même pour cette acidité (0,01 N), il peut y avoir libération de fer à partir de la ferritine si la concentration de la solution de sulfocyanure d'ammonium est trop forte ainsi qu'il ressort de l'expérience suivante :

A 1 ml de la solution de ferritine précédemment utilisée (en milieu sulfurique 0,01 N) nous avons ajouté :

— Une solution d'alun de fer dans $\text{SO}_4 \text{H}_2$ 0,01 N, correspondant à 0,1 mg de fer.

— 5 ml de sulfocyanure de concentration variable.

Le complexe rouge formé est dosé, après extraction à l'éther, au photocolorimètre à 500 m μ .

TABLEAU VI

Titre de la solution de sulfocyanure en p. 100	10	5	2,5
Fer dosé en mg (p. 0,1 mg de fer ajouté)	0,14	0,10	0,098

Précisons, par ailleurs, qu'il est nécessaire de pratiquer l'extraction éthérée en plusieurs fois. D'excellents résultats sont obtenus avec 4 extractions qu'il est souhaitable, d'ailleurs, d'effectuer aussi rapidement que possible.

Enfin, nous avons tenu à rechercher si les résultats précédents sont valables quelle que soit la quantité de ferritine en présence du fer à doser. En fait, il faut éviter une trop grande quantité de protéine ce qui

se conçoit aisément étant donné la grosse disproportion qu'il y a généralement entre le fer libre et le fer inclus dans la ferritine. Pratiquement, les résultats les meilleurs sont obtenus lorsque le rapport Fer de la protéine/Fer libre ne dépasse pas 10.

De sorte qu'en définitive, la méthode est très simple: le mélange ferritine-fer libre est acidifié de façon à réaliser une concentration en $[H^+] = 0,01$. On ajoute 5 ml d'une solution de sulfocyanure d'ammonium a 2 p. 100. Le complexe coloré est extrait à l'éther en quatre fois et le dosage est effectué au photocolorimètre à 500 m μ , sous 1 cm d'épaisseur. Il est souhaitable que la quantité de fer à doser ne soit pas supérieure à 100 γ .

I. — LIBÉRATION DU FER DE LA FERRITINE PAR LES ACIDES

Ainsi que nous l'avons déjà indiqué à plusieurs reprises, le fer de la ferritine se trouve plus ou moins complètement libéré par les acides suivant la concentration. Nous avons voulu préciser cette action des acides sur le fer de la ferritine et pour cela nous avons réalisé une étude cinétique de cette réaction à température élevée mais inférieure à 80° (c'est-à-dire au seuil de floculation irréversible de la ferritine).

On part d'une solution de ferritine contenant environ 2 mg de fer par ml, c'est-à-dire approximativement 10 mg de protéine. Cette solution est diluée au 1/20. A 1 ml de cette solution est ajouté 1 ml d'une solution d'acide sulfurique de concentration variable. Le mélange est porté dans un thermostat à 75° pendant des temps variables au bout desquels on prélève 1 ml du mélange auquel on ajoute 1 ml de persulfate d'ammonium à 2,5 p. 100 et 4 ml d'une solution de sulfocyanure d'ammonium. Il apparaît une intense coloration rouge qui est extraite en 4 fois par 20 ml d'éther. Sur la solution étherée, on dose le fer comme il vient d'être précisé. Les résultats sont indiqués dans le tableau VII. Le fer total de la ferritine est dosé après minéralisation complète de la protéine.

On se rend compte aisément de la double influence de la concentration de la solution acide et du temps de contact.

Les nombres figurants sur le tableau VII ci-dessous indiquent le pourcentage du fer libéré par rapport au fer total de la ferritine. Le temps $t = 0$ correspond au dosage effectué aussitôt après l'addition des réactifs à la température du laboratoire.

TABLEAU VII

Temps	Libération du fer de la ferritine par l'acide sulfurique pour différentes normalités du mélange ferritine-acide			
	0,05 N	0,1 N	0,25 N	0,5 N
t = 0 mn	7,1	8,2	9,0	10,1
= 5	—	—	—	73,1
= 10	—	36,9	64,6	95,4
= 15	33,2	—	—	100
= 20	—	—	83,1	—
= 25	—	47,7	—	—
= 30	47,2	—	94,6	—
= 40	—	63,1	100	—
= 60	54,1	—	—	—
= 70	—	66,1	—	—
= 120	61	—	—	—

Le graphique de la fig. 5 représente ces résultats; on voit en particulier que, lorsque la concentration en acide sulfurique est de l'ordre de 0,05 ou même de 0,1 N, la totalité du fer n'est pas libérée même au bout d'un temps assez long.

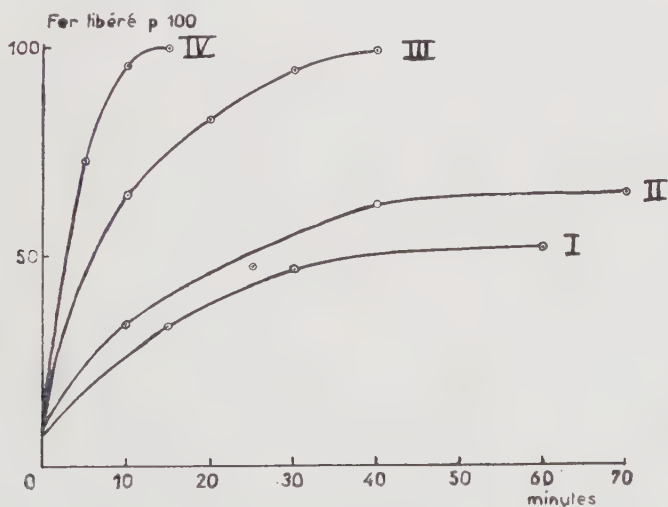


Fig. 5. — Cinétique de la libération du fer de la ferritine par l'acide sulfurique à concentrations variables et à la température de 75° C.

- Courbe I : Acide sulfurique 0,05 N.
 Courbe II : Acide sulfurique 0,1 N.
 Courbe III : Acide sulfurique 0,25 N.
 Courbe IV : Acide sulfurique 0,5 N.

Les courbes de ces graphiques sont justiciables d'une représentation exponentielle. Posons :

A_0 = p. 100 de fer libéré au temps $t = 0$;
 A = p. 100 de fer libéré après un temps suffisamment long
 $B = A - A_0$
 x = p. 100 de fer libéré au bout d'un temps t .

La relation :

$$x = A - B \cdot e^{-k t}$$

s'applique correctement aux différentes courbes. En effet, les quantités :

$\text{Log} \frac{B}{A - x}$ varie linéairement en fonction du temps, comme l'indiquent les chiffres du tableau VIII et les courbes du graphique 6 qui en sont déduites.

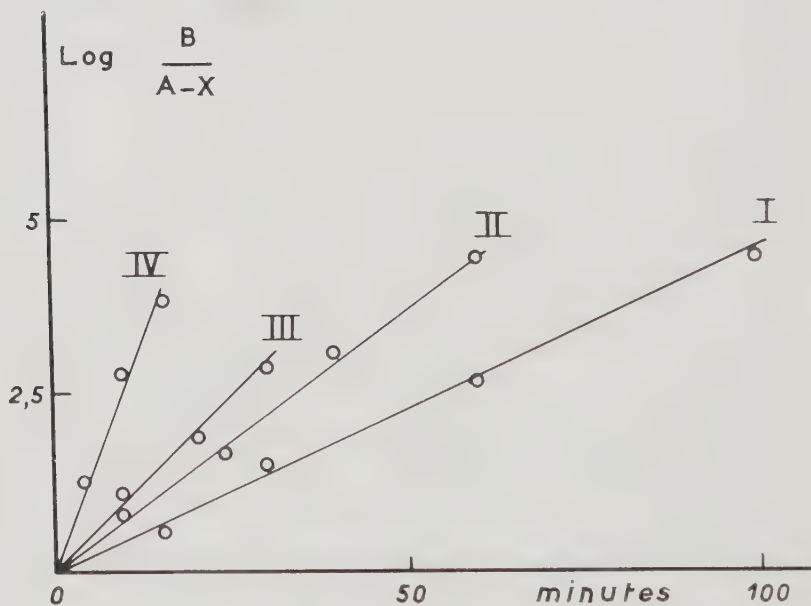


Fig. 6. — Variation en fonction du temps des quantités $\log \frac{B}{A - x}$ pour différentes acidités.

Courbe I : Acide sulfurique 0,05 N.
 Courbe II : Acide sulfurique 0,10 N.
 Courbe III : Acide sulfurique 0,25 N.
 Courbe IV : Acide sulfurique 0,50 N.

TABLEAU VIII

Temps (mn)	B $\text{Log } \frac{\quad}{A - x}$			
	SO_4H_2 0,05 N	SO_4H_2 0,1 N	SO_4H_2 0,25 N	SO_4H_2 0,5 N
0	0	0	0	0
5	—	—	—	1,26
10	—	0,69	0,97	2,8
15	0,60	—	—	—
20	—	—	1,56	—
25	—	1,47	—	—
30	1,4	—	2,83	—
40	—	3,03	—	—
60	2,6	4,30	—	—
100	4,4	—	—	—

Le calcul des constantes de vitesse relatives aux différentes acidités donne les résultats suivants :

TABLEAU IX

Normalité SO_4H_2	Constante de vitesse
0,05 N	K = 0,044
0,1	0,073
0,25	0,09
0,5	0,26

Lorsque l'on opère à 20° on observe que la concentration en acide sulfurique doit-être supérieure à 0,05 N pour qu'il y ait une libération de fer. Le graphique (7 a) représente en fonction du temps le pourcentage de fer libéré à 20° par action de l'acide sulfurique 0,2 N sur la ferritine. D'autre part le graphique (7 b) montre que la relation exponentielle précédente rend toujours compte du phénomène, la constante de de vitesse ayant la valeur : K = 0,036.

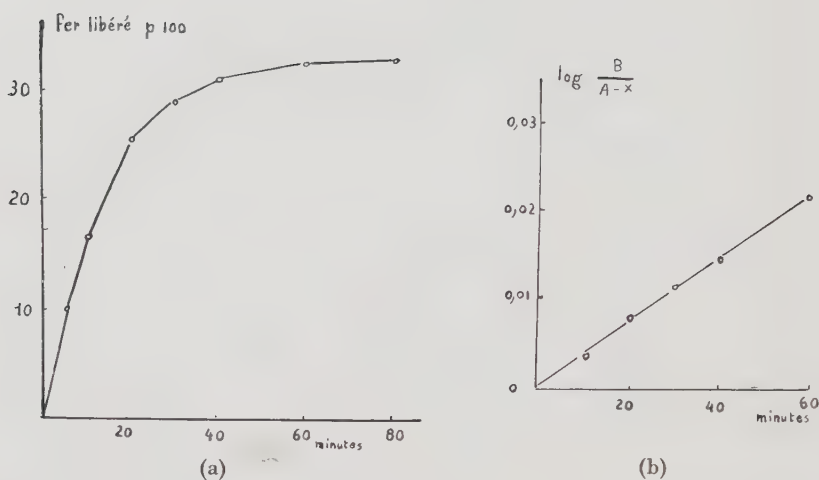


Fig. 7. — Libération du fer de la ferritine à 20° C en milieu sulfurique 0,2 N.

a) — Pourcentage de fer libéré en fonction du temps.

b) — Variation, en fonction du temps, de la quantité $\log \frac{B}{A-x}$

Nous verrons ultérieurement que l'on peut rapprocher la cinétique de la libération du fer et la cinétique de la déshydratation de l'apoferritine ainsi que les conséquences que l'on peut en tirer.

II. — LIBÉRATION DU FER ET FLOCCULATION DE LA PROTÉINE

Au cours de l'étude précédente nous avons constaté que dans la plupart des cas l'acidité qui entraîne la libération du fer provoque la floculation de la protéine. Nous avons cherché à préciser la relation existant entre ces deux phénomènes.

a) Floculation par les acides.

On prépare une série de tubes à essais contenant :

- 1 ml de solution de ferritine (soit 5 mg de ferritine);
- 1 ml d'eau;
- 2 ml d'acide sulfurique de titre variable.

On les place dans un thermostat à 37° durant 21 heures. On constate alors que les différents tubes ont les aspects suivants :

Tube 1	SO_4H_2	0,4	N	Floculat blanchâtre, Liquide surnageant incolore.
Tube 2	SO_4H_2	0,3	N	Floculat blanchâtre, Liquide surnageant incolore.
Tube 3	SO_4H_2	0,2	N	Léger floculat blanchâtre, Liquide surnageant incolore.
Tube 4	SO_4H_2	0,15	N	Léger floculat rouille, Liquide surnageant faiblement coloré.
Tube 5	SO_4H_2	0,10	N	Léger floculat rouille, Liquide surnageant faiblement coloré
Tube 6	SO_4H_2	0,05	N	Floculat pratiquement inexistant, Liquide surnageant coloré.
Tube 7	SO_4H_2	0,025	N	Floculation nulle, Liquide surnageant coloré.
Tube 8	SO_4H_2	0,005	N	Solution jaune or identique au témoin ne contenant pas d'acide.

Dans chaque cas nous avons déterminé l'azote et le fer du floculat et indiqué sur un graphique (graphique 8) leurs variations en fonction de la concentration de la solution sulfurique ajoutée.

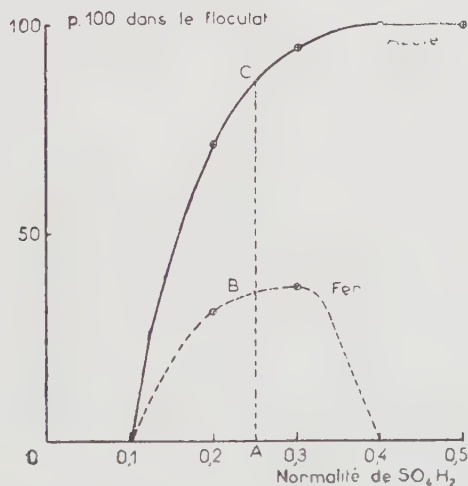


Fig. 8. — Variations du fer et de l'azote dans le floculat après traitement de la ferritine pendant 21 heures à 37° C par l'acide sulfurique de titre variable. (En abscisses, titre de la solution sulfurique ajoutée).

TABLEAU X

<i>Acidité</i>	<i>Fer précipité (p. 100 du fer total)</i>	<i>Azote précipité (p. 100 de l'azote total)</i>	<i>Fer libéré (p. 100 du fer total)</i>
0	0	0	0
0,01 N	0	0	0
0,03 N	0	0	0
0,05 N	0	0,9	0
0,1 N	31	71,5	40
0,15 N	37,7	94,3	56
0,2 N	0	100	100

La floculation protéique (Courbe I) s'effectue très régulièrement au fur et à mesure que l'acidité augmente. Mais le floculat protéique n'est pas uniquement constitué par de la ferritine (du moins par de la ferritine d'origine), il faudrait pour cela que la courbe représentant les variations du fer dans le floculat (courbe II) soit parallèle à la courbe I, ce qui n'est pas. En fait, cette courbe II présente une première partie ascendante indiquant qu'une partie au moins du fer reste dans le floculat puis lorsque l'acidité augmente, une partie descendante indiquant une libération du fer d'autant plus importante que l'acidité est plus forte.

En somme, jusqu'à une concentration en acide sulfurique de l'ordre de 0,15 N la floculation de la ferritine l'emporte (si l'on peut dire) sur la libération du fer, ce qui est attesté par l'examen macroscopique des tubes. Le tube 4 (acidité 0,15 N) est le dernier contenant un floculat rouille.

En fait, les courbes I et II du graphique 8 permettent de connaître assez bien les proportions respectives de ces deux protéines dans le mélange floculé. En effet, considérons par exemple un segment de droite ABC parallèle à l'axe des ordonnées et issu du point A d'abscisse 0,125 N. Le segment AB représente le fer du floculat soit, d'après la courbe, 35 p. 100 du fer total, donc de la ferritine totale. Le segment AC représente l'azote floculé donc l'ensemble ferritine-apoferritine, c'est-à-dire, d'après le graphique, 86 p. 100 de l'azote total, ce qui revient à dire qu'avec une acidité de la solution sulfurique 0,125 N il y a une floculation de 86 p. 100 de la protéine initiale. Sur ces 86 p. 100 :

- { 35 p. 100 sont de la ferritine.
- { 51 p. 100 de l'apoferritine.

et 14 p. 100 représentent la ferritine restée en solution.

Plus généralement voici les proportions de ferritine et d'apoferritine flocuées à différentes acidités (tableau XI) :

TABEAU XI

Acidité	Ferritine en solution (p. 100)	Ferritine floculée (p. 100)	Apo ferritine floculée (p. 100)
SO ₄ H ₂ 0,05 N	100	0	0
0,1 N	30	31	39
0,15	6	38	56
0,2	0	0	100

On suit ainsi la transformation progressive de la ferritine en apo-ferritine à différentes acidités. (Il va sans dire que ces résultats numériques correspondent à la concentration et à la nature de la solution de ferritine utilisée).

Il semble par conséquent *impossible d'obtenir en milieu acide la floculation de la ferritine sans la transformer au moins partiellement en apoferritine* (également floculée).

b) Floculation en milieu acide et en présence de pepsine.

Dans les mêmes conditions que précédemment on met en contact pendant 21 heures à 37° dans des tubes à essais :

- 1 ml d'une solution de ferritine (soit 0,9 mg de fer/ml);
- 1 ml d'une solution de pepsine à 10 p. 100;
- 2 ml d'acide sulfurique de titre variable.

Les différents tubes ont alors les aspects suivants :

Tube 1	SO ₄ H ₂	0,4	N	Solution incolore et totalement limpide.
Tube 2	SO ₄ H ₂	0,3	N	Solution incolore et totalement limpide.
Tube 3	SO ₄ H ₂	0,2	N	Solution incolore et limpide surmontant un léger flocculat.
Tube 4	SO ₄ H ₂	0,1	N	Léger flocculat rouille. Liquide surnageant incolore.
Tube 5	SO ₄ H ₂	0,05	N	Léger flocculat rouille. Liquide surnageant incolore.
Tube 6	SO ₄ H ₂	0,025	N	Flocculat rouille. Liquide surnageant légèrement teinté (jaune or).
Tube 7	SO ₄ H ₂	0,005	N	Solution jaunâtre louche, identique au témoin.
Tube 8	SO ₄ H ₂	0,000		Solution jaunâtre louche.

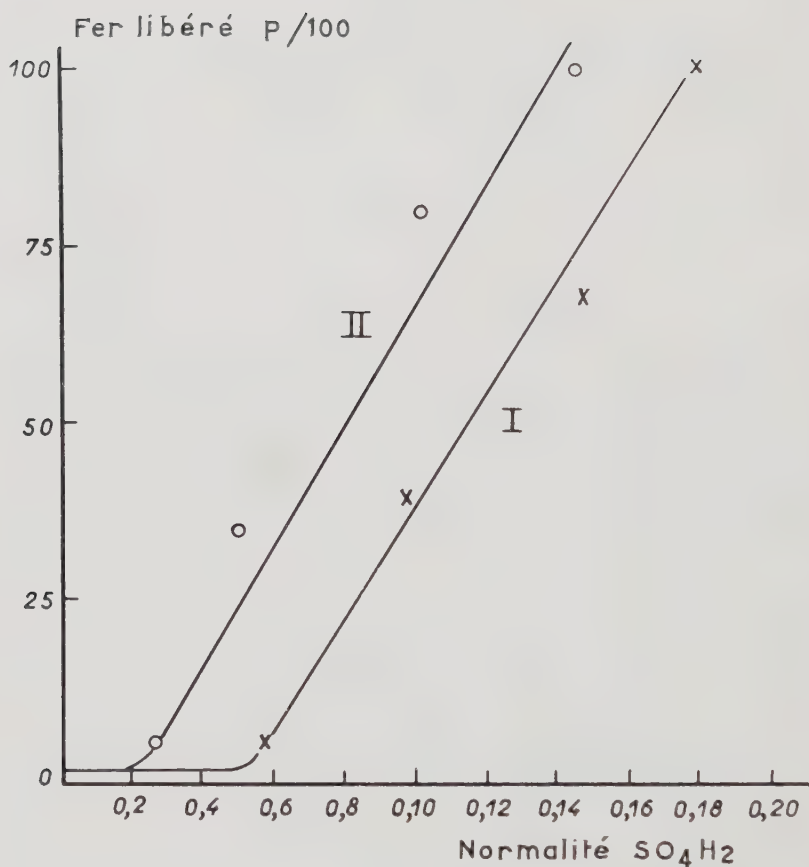


Fig. 9. — Pourcentage du fer libéré par l'acide sulfurique de concentrations variables après 21 heures à 37° C.

Courbe I : Action de l'acide sulfurique seul.

Courbe II : Action de l'acide sulfurique en présence de pepsine.

Les deux courbes du graphique 9 représentent, comparativement, les proportions de fer libéré, en milieu d'acidité variable, en présence et en absence de pepsine. Il est évident que la présence de pepsine active considérablement la mobilisation. Cette activation se traduit de la façon suivante :

1° La quantité de fer libéré pour une acidité donnée est plus grande en présence de pepsine. Par exemple en milieu SO_4H_2 0,1 N les pourcentages sont : 40 p. 100 pour l'acide sulfurique seul contre 80 p. 100 dans le cas de l'association acide - pepsine.

2° L'acidité minima nécessaire à la libération du fer est plus faible en présence de pepsine que dans le cas de l'acide seul. En effet, les « seuils de libération » correspondent à :

- acidité 0,02 N pour l'association acide-pepsine.
- acidité 0,05 N pour l'acide seul.

Les déterminations quantitatives (dosages du fer et de l'azote dans la phase aqueuse surnageante) donnent les résultats suivants :

TABLEAU XII

<i>Tube</i>	<i>Acidité</i>	<i>Fer précipité en p. 100</i>	<i>Azote précipité en p. 100</i>	<i>Fer libéré en p. 100</i>
1	0,4 N	0	0	100
2	0,3 N	0	0	100
3	0,2 N	0	0	100
4	0,1 N	20	25	80
5	0,05 N	65	70	35
6	0,025 N	70	75	5
7	0,005 N	0	0	0
8	0	0	0	0

Ces résultats nous paraissent devoir être rapprochés de ceux d'une étude de MAZUR, LITT et SHORR [25] concernant l'hydrolyse pepsique de la ferritine. Ces auteurs ont en effet montré que la ferritine est d'autant mieux attaquée par la pepsine que sa teneur en fer est moins forte, ainsi qu'il ressort des chiffres ci-après :

TABLEAU XIII

<i>Rapport Fe/N de la ferritine utilisée</i>	<i>Protéine hydrolysée p. 100</i>
1,55	11
1,04	26
0,00	52

Tout se passe comme si le fer formait un obstacle à l'action de la pepsine, c'est-à-dire bloquait la structure secondaire de la ferritine puisqu'il est admis que l'action hydrolysante de la pepsine commence par une altération de la structure secondaire des protéines.

Inversement, en ce qui concerne nos observations personnelles, il nous semble que l'on peut dire que la « sensibilisation » par la pepsine de la ferritine vis-à-vis des acides est due à l'action dénaturante de cet enzyme s'exerçant sur la structure secondaire des protéines, donc permettant une plus facile libération du fer.

C'est pourquoi nous avons cherché encore à préciser cette notion en recherchant si la labilité du fer en milieu acide est également augmentée lorsque la ferritine a été préalablement floculée.

ACTION DES ACIDES SUR DE LA FERRITINE FLOCULÉE

On peut obtenir la floculation de la ferritine en milieu neutre soit par relargage, soit par la chaleur à une température supérieure à 80°. Dans le premier cas, la redissolution est possible en diminuant la concentration en électrolyte (floculation réversible) dans le second cas, la floculation est irréversible: il y a dénaturation. Les expériences suivantes ont pour but d'étudier la labilité du fer lorsque la ferritine a été floculée par l'une et l'autre méthode.

Nous avons réalisé une étude comparative de la libération du fer par les acides à partir de ferritine ayant subi des traitements variables.

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

Dans 3 séries de tubes à essais, on introduit 4 ml d'une solution de ferritine (correspondant à 1 mg de fer).

— La ferritine de la série I ne subit *aucun* traitement.

— La ferritine de la série II est floculée par addition de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ cristallisé (concentration finale = 30 p. 100).

— La ferritine de la série III est portée à l'ébullition, puis ramenée à la température de 20° C.

On ajoute alors à chaque tube 1 ml d'une solution d'acide sulfurique de titre variable.

Après 10 minutes de contact, on dose le fer libéré. Les résultats sont les suivants :

TABLEAU XIV

Acidité du milieu	p. 100 de fer libéré en dix minutes		
	Série I	Série II	Série III
SO_4H_2 0 N	0	0	0
0,01	0	0	0
0,03	0	0	3
0,04	0	0	
0,05	Traces	Traces	12
0,08	—	—	20
0,10	10	9	25
0,20	17	14	48

Les courbes du graphique 10 rendent compte de ces résultats.

Nous voyons que, pour les séries I et II, qui correspondent respectivement à de la ferritine en solution ou floculée par le sulfate d'ammonium, il y a un parallélisme presque parfait.

a) Les pourcentages de fer libéré pour une même acidité sont très voisins et peuvent être confondus.

b) Les « seuils de libération » sont identiques et correspondent à une acidité 0,05 N.

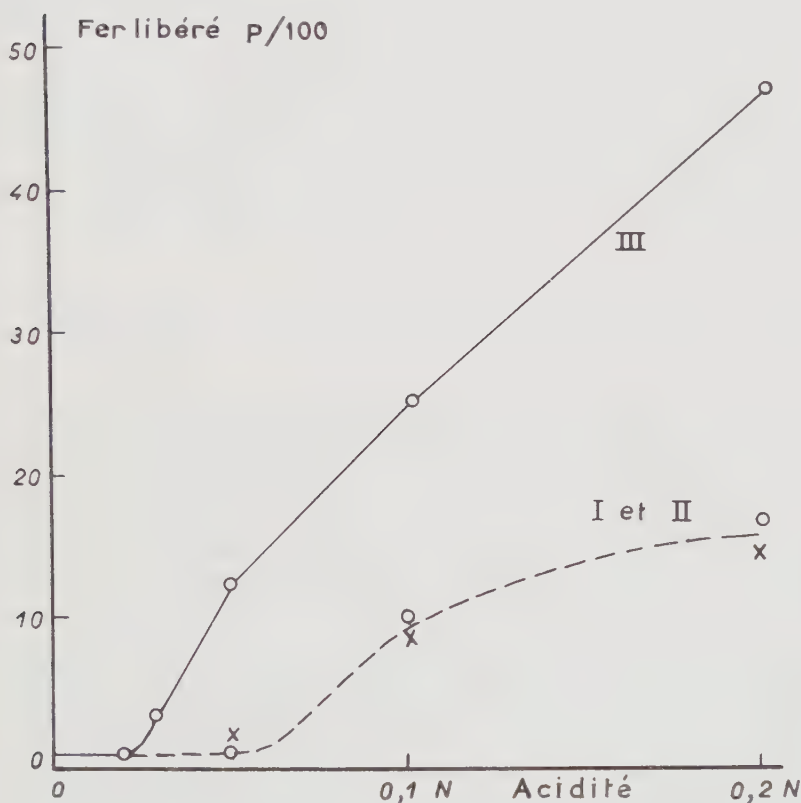


Fig. 10. — Étude comparée de la libération du fer à partir de ferritine ayant subi un traitement préalable.

Courbe I : Aucun traitement (-o-o-o-).

Courbe II : Ferritine floculée par le sulfate d'ammonium (x-x-x).

Courbe III : Ferritine floculée par la chaleur.

Par contre, pour la série III, qui correspond à de la ferritine floculée préalablement par la chaleur, on observe que le phénomène de mobilisation est beaucoup plus rapide.

Pour une même acidité, le pourcentage de fer libéré est plus important que dans les deux cas précédents.

Le seuil de libération est situé aux environs de 0,02 N contre 0,05 N pour les séries I et II.

La libération du fer s'effectue donc très sensiblement de la même façon dans le cas de la ferritine en solution aqueuse et dans celui de la ferritine floculée par le sulfate d'ammonium. Par contre, la libération est beaucoup plus rapide dans le cas de la ferritine floculée *irréversiblement donc dénaturée* par la chaleur.

La floculation n'accélère donc la libération du fer que dans la mesure où elle est irréversible et s'accompagne de modifications structurales.

Ces faits confirment la notion de la participation du fer à la structure de la ferritine.

III. — ACTION DE LA SOUDE SUR LA FERRITINE

On sait, depuis l'étude qu'en a fait GRANICK en 1944 [15] et à laquelle nous nous sommes déjà référés au début de ce travail, que la ferritine, en présence de soude, perd son fer qui flocule tandis que la protéine reste en solution (tout au moins la plus grande partie : 90 p. 100 selon GRANICK et 95 à 100 p. 100 selon nos observations personnelles). Au premier abord, le mécanisme de la mobilisation du fer paraît être ici différent de celui que nous avons étudié précédemment puisqu'il n'y a pas de floculation préalable de la protéine.

Cependant, il semble bien, ainsi qu'il ressort de l'expérience suivante réalisée par MAZUR, LITT et SHORR [26], que la soude agit en dénaturant la protéine, c'est-à-dire en altérant sa structure secondaire par un mécanisme comparable à celui que l'on observe avec les acides.

On sait en effet que l'hydrolyse enzymatique d'une protéine est d'autant plus rapide que le substrat est plus dénaturé. Or MAZUR et coll. étudiant l'hydrolyse trypsique de la ferritine et de l'apoferritine, soumises au préalable à l'action de réactifs dénaturants tels que la soude, l'urée, l'urée + la soude, ont montré que la proportion de protéine hydrolysée en un même temps augmente avec la sévérité du traitement auquel sont soumises ces protéines, ainsi qu'il ressort des valeurs ci-dessous :

TABLEAU XV

Traitement préalable	p. 100 de ferritine hydrolysée par la trypsine après 30 minutes	
	Ferritine	Apo ferritine
Aucun	20	19
NaOH (pH = 12)	28	25
Urée (40 p. 100)	25	22
Urée + NaOH	56	59

Cette augmentation de la proportion de protéine hydrolysée, qui ne peut s'interpréter que par une dénaturation de plus en plus grande de la protéine, prouve, en quelque sorte, l'action dénaturante de la soude sur la ferritine. *La dénaturation doit donc être à nouveau rapprochée de la libération du fer.*

IV. — ACTION DES RÉDUCTEURS SUR LA FERRITINE

Nous avons déjà signalé (voir préparation de l'apoferritine) qu'il est possible de mobiliser le fer de la ferritine sans dénaturation de la fraction protéique en faisant agir des réducteurs (hydrosulfite de sodium par exemple) en présence de corps tels que l'ortho-phénanthroline ou l' α - α' -dipyridyle capables de former un complexe avec le fer ferreux, le pH (4,6) nécessaire à la réaction correspondant sensiblement au pH isoélectrique de la ferritine. Il ne se produit dans ce cas aucune dénaturation de la protéine. Si par contre, l'on traite par une solution d'hydrosulfite de sodium à 10 p. 100 de la ferritine ayant été au préalable floculée par la chaleur (ébullition) on constate qu'après agitation, contact de 5 minutes et filtration, le filtrat contient une abondante quantité de fer. Après 10 minutes de contact, la totalité du fer est libérée.

En somme, nous constatons à nouveau que si la dénaturation de la protéine n'est pas nécessaire à la mobilisation du fer elle constitue un moyen d'activer sa libération(*).

(*) L'hydrosulfite de sodium est capable en milieu neutre, même en l'absence de tout réactif susceptible de masquer le fer (tel que l' α - α' -dipyridyle ou l'orthophénanthroline), de provoquer la mobilisation du fer. Il suffit pour cela d'introduire dans un sac de cellophane :

CONCLUSION

Les faits qui viennent d'être exposés peuvent se résumer ainsi :

1° en milieu acide, la ferritine ne libère son fer (ferrique) que dans la mesure où sa partie protéique est dénaturée et floculée, c'est-à-dire lorsqu'est atteinte (détruite) sa structure secondaire.

2° En milieu alcalin, même en l'absence de floculation préalable, la libération du fer est possible mais la structure protéique est modifiée, modification entraînant une mobilité électrophorétique nulle.

3° En milieu neutre mais en présence de réducteurs, le fer de la ferritine devenu bivalent est libéré *sans qu'il y ait dénaturation de la protéine*, alors que dans les deux cas précédents le fer, resté trivalent, n'est labile que secondairement à la dénaturation de la protéine. On pourrait en conclure que la liaison fer-protéine intéresse plus particulièrement l'une des trois valences du fer. Mais il est aussi possible que la labilité du fer, augmentée en présence de réducteurs, relève de la plus grande solubilité de l'hydroxyde ferreux par rapport à celle de l'hydroxyde ferrique.

4° Dans les différents cas précédents, la dénaturation préalable de la ferritine (floculation par la chaleur, traitement par la pepsine, l'urée...) active considérablement la libération du fer.

On peut donc en conclure, de façon très générale, que le fer participe à la structure protéique.

— 4 ml d'une solution de ferritine;

— 1 ml d'une solution d'hydrosulfite de Na à 10 p. 100.

Le sac est alors porté dans un récipient cylindrique de faible diamètre et rempli d'une solution d'hydrosulfite de sodium à 2 p. 100. Au bout d'un quart d'heure, on peut mettre en évidence une quantité notable de fer ferreux à l'extérieur du sac de cellophane (par exemple par l'apparition d'une coloration rouge après addition de dipyridyle ou encore par la réaction au sulfocyanure après avoir ajouté une quantité convenable d'un oxydant).

La totalité du fer peut être éliminée de cette façon mais le temps nécessaire à la réaction est 4 à 5 fois plus long qu'en présence d' α - α' -dipyridyle.

Ainsi, ni le dipyridyle, ni l'o-phénanthroline ne sont nécessaires à la préparation de l'apoferritine. Leur rôle est simplement d'accélérer le départ du fer par un mécanisme qui paraît être très simple : en masquant le fer au fur et à mesure de sa production ces composés déplacent en quelque sorte l'équilibre existant entre le fer fixé à la protéine et le fer présent dans le milieu extérieur.

CHAPITRE III

ETUDE DE L'HYDRATATION RELATIVE DE L'APOFERRITINE PAR RAPPORT A LA FERRITINE

INTRODUCTION

Les multiples groupements polaires contenus dans les molécules protéiques leur confèrent une grande hydrophilie, qui rend compte de la stabilité de leurs solutions ainsi que de diverses propriétés physico-chimiques. Quel que soit le terme que l'on adopte pour désigner cette affinité pour l'eau, le fait ne peut être mis en doute : les phénomènes de gonflement, d'imbibition, les anomalies osmotiques, la viscosité, le comportement vis-à-vis de la sédimentation... suggèrent souvent qu'une fraction non négligeable du solvant (l'eau généralement) est susceptible de contracter avec certains groupements polaires des liaisons, d'ailleurs mal définies, dont le double résultat est de modifier les propriétés physiques des protéines et de masquer cette fraction d'eau en lui enlevant (ou en modifiant) ses propriétés habituelles. D'où les termes d'eau non solvante, d'eau non congelable que divers travaux ont essayé de préciser en mesurant ces fractions d'eau n'ayant pas les propriétés habituelles de l'eau pure.

Des divergences apparaissent fréquemment sur l'appréciation quantitative de l'eau ainsi dissimulée, voir sur son existence. Il est vraisemblable qu'elles proviennent au moins en partie de la diversité des méthodes utilisées qui, ne faisant pas appel à la même propriété, ne mesurent pas la même grandeur.

Dans le présent chapitre, nous aborderons de la façon suivante l'étude de l'hydratation de l'apoferritine. Nous supposons en somme le problème résolu (par MICHAELIS et GRANICK) et admettrons que cette protéine contient une quantité importante d'eau; cela étant, diverses propriétés physico-chimiques (et en particulier leur différence par rapport à la ferritine considérée comme pas ou beaucoup moins hydratée) s'expliquent aisément. Nous avons ainsi étudié la floculation par la chaleur, la précipitation par les sels minéraux, le comportement osmotique, la viscosité de l'apoferritine et de la ferritine.

Par ailleurs, nous avons pu montrer que la résistance à la déshydratation, à température modérée, des solutions protéiques, peut mettre en évidence le fait que la totalité de l'eau de ces solutions ne s'élimine pas à la même vitesse. La représentation du phénomène en coordonnées semi-logarithmique permet une détermination quantitative approximative.

La confrontation de cet ensemble de faits démontre indirectement, l'hydratation de l'apoferritine et permet de préciser à la fois le rôle de l'eau dans la structure de l'apoferritine et celui du fer dans la molécule de ferritine.

ÉTUDE DE LA STABILITÉ DES SOLUTIONS DE FERRITINE ET D'APOFERRITINE

1^o RELATION ENTRE LA STABILITÉ DES SOLUTIONS COLLOIDALES ET L'HYDRATATION DES GRANULES.

La stabilité d'une solution colloïdale est liée à son état de dispersion, la floculation intervenant lorsque les particules dispersées s'unissent entre elles sous l'action des forces de cohésion, dont nous allons préciser la nature, c'est-à-dire lorsque ces particules perdent leur indépendance pour former des agregats de grandes dimensions. Lorsque rien ne s'oppose aux forces de cohésion, l'agrégation se produit spontanément, facilité par le mouvement Brownien qui tend à rapprocher les particules les unes des autres. Par contre, la floculation ne se produit pas, ou du moins se produit plus difficilement, lorsque les particules portent des charges électriques de même signe : dans ce cas, en effet, les forces électrostatiques de répulsion s'opposent aux forces de cohésion. La charge électrique des granules est donc un facteur de stabilité.

Mais la stabilité des solutions colloïdales est également liée à l'intensité des forces responsables de la tension superficielle. En effet, lorsque deux phases non miscibles sont en présence, il existe aux interfaces des forces (tension superficielle) qui tendent à diminuer la surface de contact entre les deux phases.

Il est donc évident que toute cause susceptible de diminuer la tension interfaciale diminue en même temps les forces de cohésion et par conséquent augmente la stabilité. L'expérience montre du reste que l'on favorise la dispersion de nombreux colloïdes par addition au liquide intergranulaire de corps susceptibles d'abaisser la tension interfaciale : (par exemple, alcool, sulforicinate, etc...).

L'hydratation des granules est un facteur de stabilité précisément dans la mesure où elle provoque une diminution de la tension interfaciale. Le mécanisme en est très simple : les particules hydrophiles sont

capables de fixer superficiellement par des forces assez intenses (de nature chimique comme le montre leur réversibilité) des quantités importantes d'eau qui forment autour de chacune d'elles une couche isolante et protectrice. De telle sorte que l'interface initial solide-liquide est remplacé par un autre interface dont les deux constituants sont des milieux de structures voisines, l'un étant constitué par de l'eau solvante, l'autre par de l'eau d'hydratation fixée sur le granule : la tension interfaciale y est donc très faible, pour ne pas dire nulle.

Il est par conséquent évident que pour deux protéines telles que la ferritine et l'apoferritine que rien ne semble distinguer, ni du point de vue de leur structure (diagrammes de diffraction des rayons X identiques, isomorphisme cristallin, propriétés immunologiques identiques), ni du point de vue de leur état électrique (mobilités électrophorétiques égales), toute différence de stabilité signifie nécessairement une différence d'hydratation.

Pour caractériser ces différences éventuelles de stabilité entre la ferritine et l'apoferritine nous nous sommes adressés à l'étude comparative de leur floculation : il est en effet évident qu'une solution protéique est d'autant plus stable qu'il est plus difficile de la floculer.

2° FLOCCULATION DES SOLUTIONS DE FERRITINE ET D'APOFERRITINE.

Les observations que nous rapportons dans ce paragraphe concernent les caractères de floculation par la chaleur et par le sulfate d'ammonium des solutions de ferritine et d'apoferritine.

a) Floculation par la chaleur.

L'étude de la floculation par la chaleur de solutions de ferritine et d'apoferritine a été réalisée par LAUFBERGER [1] ainsi que par MICHAELIS et GRANICK [1] ; nos résultats personnels concordent parfaitement avec ceux de ces auteurs et peuvent se résumer ainsi :

— Si l'on chauffe une solution de ferritine, on observe une floculation réversible dans la mesure où la température ne dépasse pas 80°; la totalité du floculat repasse alors en solution par refroidissement. Mais, si la température dépasse 80°, une partie seulement du floculat repasse en solution par refroidissement : la fraction qui reste insoluble est d'autant plus importante que la température à laquelle a été portée le mélange est plus éloignée de 80°.

— Pour les solutions d'apoferritine le phénomène est différent puisque la floculation n'apparaît qu'aux environs de 90°; cette floculation est irréversible et totale d'emblée.

De cette différence de comportement on peut, semble-t-il, déduire que :

1^o La ferritine est la plus altérable que l'apoferritine et par conséquent, moins stable.

2^o La réversibilité de la floculation de la ferritine dans un certain domaine de température peut signifier soit l'existence d'un équilibre entre une forme dénaturée et une forme non dénaturée de la ferritine, soit une hétérogénéité dont la nature resterait à préciser.

3^o L'apoferritine apparaît comme homogène puisque sa floculation est irréversible et totale d'emblée.

L'étude de la floculation de ces deux protéines par le sulfate d'ammonium, que nous allons exposer maintenant, permet de préciser les faits.

b) Précipitation fractionnée des solutions de ferritine par le sulfate d'ammonium.

Cette étude a été réalisée de la façon suivante :

— 10 ml d'une solution de ferritine pure, contenant 26 mg de fer et 14,85 mg d'azote protéique, sont introduits dans un tube à centrifuger ainsi que des quantités croissantes de sulfate d'ammonium, la solution étant agitée après chaque addition de sel.

Tant que la concentration en sulfate d'ammonium reste inférieure à $c = 22$ p. 100, la solution reste limpide. Pour $c = 23$ p. 100 apparaît un trouble. Le floculat ainsi obtenu est séparé par centrifugation. Au liquide surnageant on ajoute à nouveau une petite quantité de sulfate d'ammonium et l'on sépare, comme précédemment, le floculat obtenu. L'opération est répétée jusqu'à ce que la solution reste limpide par addition de sulfate d'ammonium, ce qui se trouve réalisé lorsque $c = 30$ p. 100.

Par ce procédé, et avec des écarts de concentration en sulfate d'ammonium de l'ordre de 1 p. 100 environ, nous avons pu fractionner, dans l'expérience rapportée ci-dessous, 7 floculats différents (*).

(*) Dans d'autres expériences du même type, mais avec des écarts de concentration en sulfate d'ammonium plus petits, il est possible de multiplier le nombre des floculats : les résultats alors obtenus sont comparables à ceux que nous indiquons ici.

Le fer et l'azote protéique sont dosés dans chacune des solutions obtenues par dissolution dans l'eau de chacun des floculats isolés comme il vient d'être précisé. Les résultats obtenus sont indiqués dans le Tableau XVI.

TABLEAU XVI

Floculat n°	Concentration du $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ (en g p. 100)	Fer (en mg)	Azote (en mg)	$\frac{\text{Fer}}{\text{Azote}}$
1	23	2	0,93	2,25
2	24,5	6,8	3,42	1,98
3	25,2	7,9	4,31	1,83
4	26	5,0	2,91	1,71
5	27	2,5	1,70	1,46
6	27,8	1,4	1,38	1,01
7	30	0,4	0,54	0,74
8	31	0,0	0,00	—

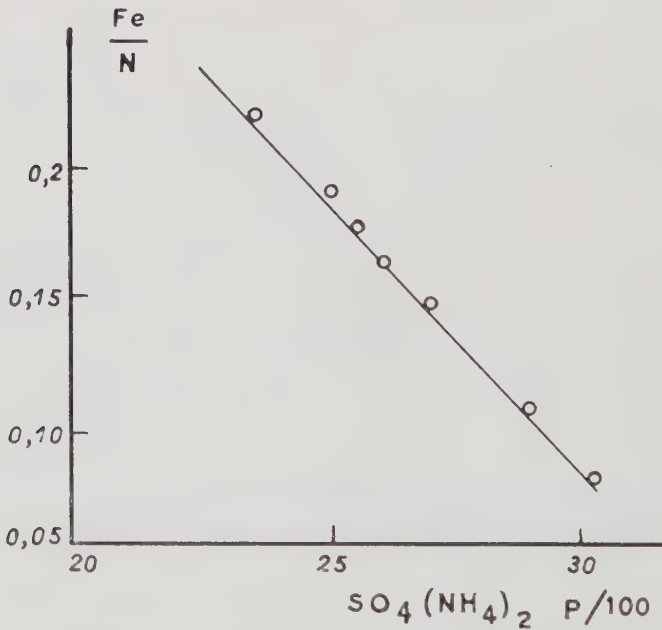


Fig. 11. — Variations en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium, de la teneur en fer (caractérisée par le rapport Fe/N) des échantillons de ferritine fractionnés par le sulfate d'ammonium.

Ces résultats, qu'illustre le graphique 11, montrent que le rapport Fe/N décroît régulièrement pour ces différents floculats : il est d'autant plus petit que la concentration du sulfate d'ammonium pour réaliser la floculation est plus grande.

De telle sorte que l'hétérogénéité d'une préparation donnée de ferritine provient de ce que le rapport pondéral de la partie protéique à la fraction minérale n'est pas le même pour toutes les molécules. Cette notion est du reste confirmée et précisée par l'étude du diagramme d'ultracentrifugation (fig. 12).

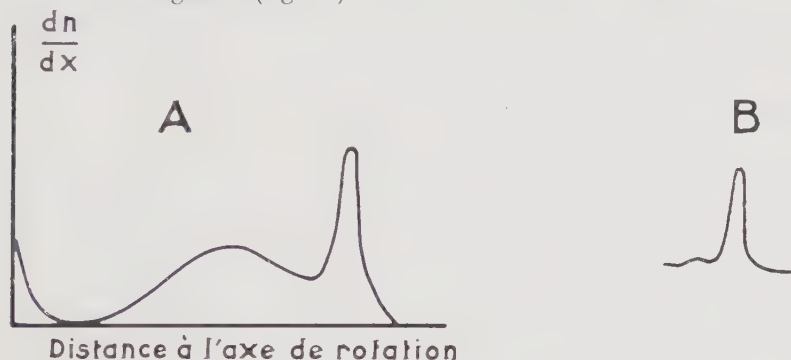


Fig. 12. — Diagrammes d'ultracentrifugation de ferritine et d'apoferritine (selon ROTHEN).

A : La ferritine n'est pas homogène. Le pic le plus élevé correspond à de l'apoferritine qui représente près de 20 p. 100 de la protéine présente. Le second clocher correspond à de la ferritine : il est étalé en raison de l'inconstance de la teneur en fer.

B : L'apoferritine est homogène. On peut cependant remarquer la présence d'un composé plus lourd qui représente une impureté.

REMARQUE

On pourrait contester la valeur de ces résultats du fait que les dosages de l'azote protéique sont réalisés à partir de solutions riches en sulfate d'ammonium. Les quelques indications suivantes enlèvent, nous semble-t-il, toute valeur à une telle objection.

La technique que nous avons utilisée pour le dosage de l'azote protéique est la suivante : un volume de la solution de ferritine à doser est traité par de l'acide chlorhydrique en quantité telle que la concentration finale soit 2 N. La ferritine, floculée, est séparée par centrifugation. Le floculat est alors lavé par ClH 2 N et, à nouveau, séparé par centrifugation. Cette opération est répétée trois fois. Puis le floculat ainsi débarrassé des sels minéraux est transvasé quantitativement dans un ballon de Kjeldahne et minéralisé.

Dessais à blanc nous ont montré que la quantité d'azote ammoniacal éliminé par lavage représente au maximum 1 p. 100 de l'azote protéique, ce qui justifie l'utilisation de cette technique.

Remarquons, de plus, que la somme des quantités d'azote contenu dans chaque fraction est égale à 15,20 mg, tandis que la quantité totale d'azote contenu dans un volume correspondant (10 ml) de la solution initiale est égale à 14,85 mg (dosé directement sur la solution initiale). L'écart entre ces quantités est égal à : $15,20 - 14,85 = 0,35$ mg, ce qui représente une erreur de :

$$\frac{0,35}{15} \cdot 100 = 2,3 \text{ p. } 100$$

Cette erreur se trouvant introduite après 7 dosages.

c) *Précipitation fractionnée des solutions d'apoferritine par le sulfate d'ammonium.*

L'apoferritine utilisée pour cette étude, a été préparée non par la méthode habituelle décrite par MICHAELIS et GRANICK, mais par une variante de cette méthode que nous avons exposée au début de ce travail. Rappelons que cette technique, plus rapide que la méthode initiale, est donc vraisemblablement plus brutale, ce qui, à notre avis, provoque quelques modifications de l'apoferritine : ces modifications ne concernent d'ailleurs ni l'aptitude à la cristallisation (pas plus que la morphologie des cristaux), ni l'homogénéité électrophorétique.

Le mode expérimental pour l'étude de la floculation de l'apoferritine par le sulfate d'ammonium est le suivant :

— A un volume donné d'une solution d'apoferritine est ajouté du sulfate d'ammonium. La floculation n'apparaît que pour des concentrations en sulfate d'ammonium de l'ordre de 30 p. 100. Le floculat obtenu pour cette concentration est séparé par centrifugation, on observe alors qu'en ajoutant de nouvelles quantités de sulfate d'ammonium ($c = 32$ p. 100), il se produit une nouvelle floculation. En répétant l'opération on peut encore séparer deux autres floculats pour des concentrations en sulfate d'ammonium égales à 37 p. 100 et 45 p. 100.

La possibilité de fractionner l'apoferritine par relargage témoigne d'une certaine hétérogénéité de cette protéine, alors que plusieurs faits militent en faveur de son homogénéité (*du moins par comparaison avec la ferritine*) :

— Le comportement vis-à-vis de la chaleur dont nous avons parlé plus haut.

— Le diagramme d'ultra-centrifugation, réalisé par ROTHEN à partir d'apoferritine, montre un « pic » unique (fig. 12).

Le problème posé est donc celui de l'origine de cette hétérogénéité vis-à-vis du sulfate d'ammonium, hétérogénéité que deux hypothèses au moins sont susceptibles d'expliquer :

1^o toutes les molécules d'apoferritine ne seraient pas également hydratées et, par conséquent, seraient inégalement stables en présence d'électrolytes.

2^o L'apoferritine préparée « in vitro » dans les conditions précisées plus haut est un mélange de molécules de masses différentes.

L'étude des pressions osmotiques développées par des solutions de ferritine de rapport Fe/N variable et d'apoferritine permet de préciser les faits.

PRESSION OSMOTIQUE DES SOLUTIONS DE FERRITINE ET D'APOFERRITINE

1^o CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.

Les pressions osmotiques ont été mesurés avec l'osmomètre de HELFRITZ (fig. 13). Avant leur emploi, les solutions protéiques sont longuement dialysées contre de l'eau distillée. Le pH des solutions se maintient, durant les mesures, à la valeur $\text{pH} = 4,5$ c'est-à-dire au voisinage immédiat du point isoélectrique commun de la ferritine et de l'apoferritine (voir annexe p. 108).

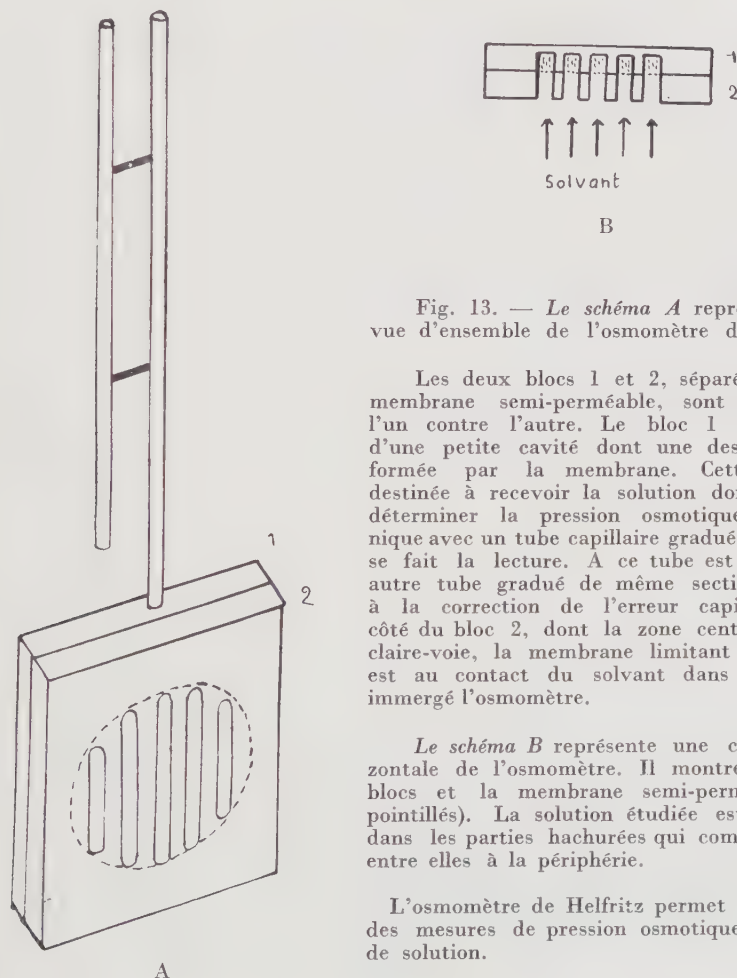


Fig. 13. — Le schéma A représente une vue d'ensemble de l'osmomètre de Helfritz.

Les deux blocs 1 et 2, séparés par une membrane semi-perméable, sont maintenus l'un contre l'autre. Le bloc 1 est creusé d'une petite cavité dont une des faces est formée par la membrane. Cette cavité, destinée à recevoir la solution dont on veut déterminer la pression osmotique, communique avec un tube capillaire gradué sur lequel se fait la lecture. À ce tube est associé un autre tube gradué de même section destiné à la correction de l'erreur capillaire. Du côté du bloc 2, dont la zone centrale est à claire-voie, la membrane limitant la cavité est au contact du solvant dans lequel est immergé l'osmomètre.

Le schéma B représente une coupe horizontale de l'osmomètre. Il montre les deux blocs et la membrane semi-perméable (en pointillés). La solution étudiée est contenue dans les parties hachurées qui communiquent entre elles à la périphérie.

L'osmomètre de Helfritz permet d'effectuer des mesures de pression osmotique avec 3 ml de solution.

2° PRESSIONS OSMOTIQUES DÉVELOPPÉES PAR DES SOLUTIONS DE FERRITINE DE TENEUR EN FER VARIABLE.

Nous avons utilisé différents échantillons de ferritine, de teneur en fer variable, obtenus par précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium. Les mesures dont nous rendons compte dans le Tableau XVII concernent les échantillons de rapports Fe/N respectivement égaux à : 2,25 - 1,80 - 1,12 - 0,53.

Pour chaque échantillon, nous avons mesuré la pression osmotique pour différentes concentrations protéiques c .

TABLEAU XVII

Fe/N	Concentration protéique c (g/l)	Pression osmotique mesurée p (cm H_2O)	$\frac{p}{c}$
2,25	13,5	0,75	0,055
	8,0	0,43	0,053
	5,0	0,26	0,052
1,80	25,0	1,40	0,056
	16,6	0,90	0,054
	10,0	0,53	0,053
	5,0	0,26	0,052
1,12	12,2	0,73	0,060
	7,6	0,45	0,059
	4,0	0,23	0,058
0,53	16,4	1,15	0,070
	8,5	0,59	0,069
	3,0	0,20	0,068

Les graphiques de la fig. 14 rendent compte de ces résultats; ils représentent les variations du rapport p/c en fonction de la concentration protéique pour les différents échantillons étudiés.

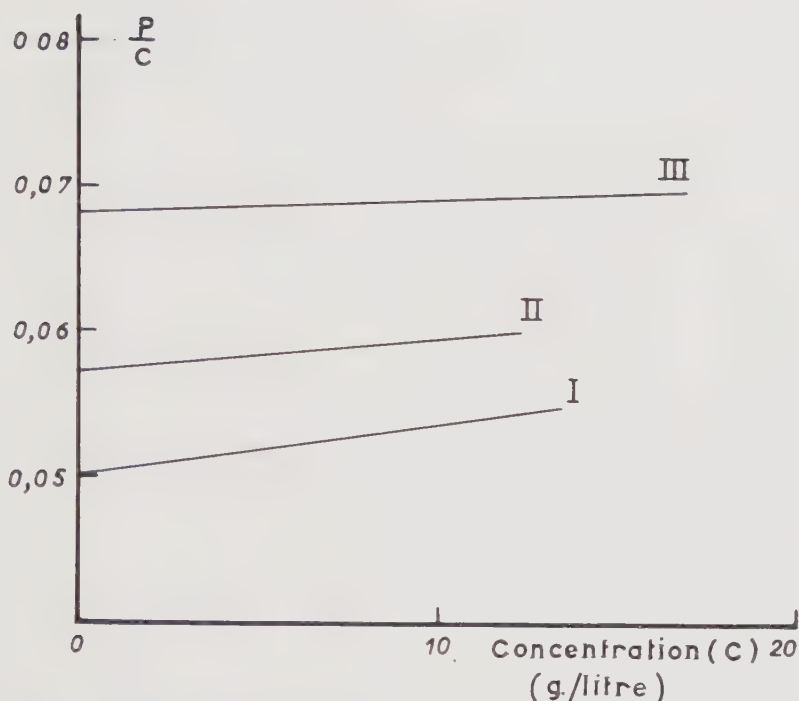


Fig. 14. — Variation du rapport p/c en fonction de la concentration pour des échantillons de ferritine de teneurs en fer variables.

Courbe I : $Fe/N = 2,25$

Courbe II : $= 1,12$

Courbe III : $= 0,53$

3° PRESSIONS OSMOTIQUES DÉVELOPPÉES PAR DES SOLUTIONS D'APO-FERRITINE.

Les mesures osmotiques ont été faites, d'une part, sur des solutions d'apoferritine non fractionnées par le sulfate d'ammonium, et, d'autre part, sur les 3 premières fractions isolées, comme nous l'avons indiqué plus haut, par le sulfate d'ammonium aux concentrations respectives de 30 p. 100, 32 p. 100 et 37 p. 100.

Dans le cas des solutions d'apoferritine non fractionnées, les pressions osmotiques observées sont considérables. Pour deux solutions différentes d'apoferritine, les valeurs de p/c sont trouvées égales à 0,52 pour la première et 0,35 pour la seconde : il y a là un net décalage avec les valeurs de p/c déterminées pour des échantillons de ferritine de teneur en fer variable.

Dans le cas des premières fractions isolées par le sulfate d'ammonium, on observe que les rapports p/c sont plus faibles ainsi qu'il ressort du Tableau XVIII.

Remarquons que pour ces différentes fractions d'apoferritine comme pour les différents échantillons de ferritine, les variations de p/c en fonction de c sont pratiquement linéaires (fig. 15).

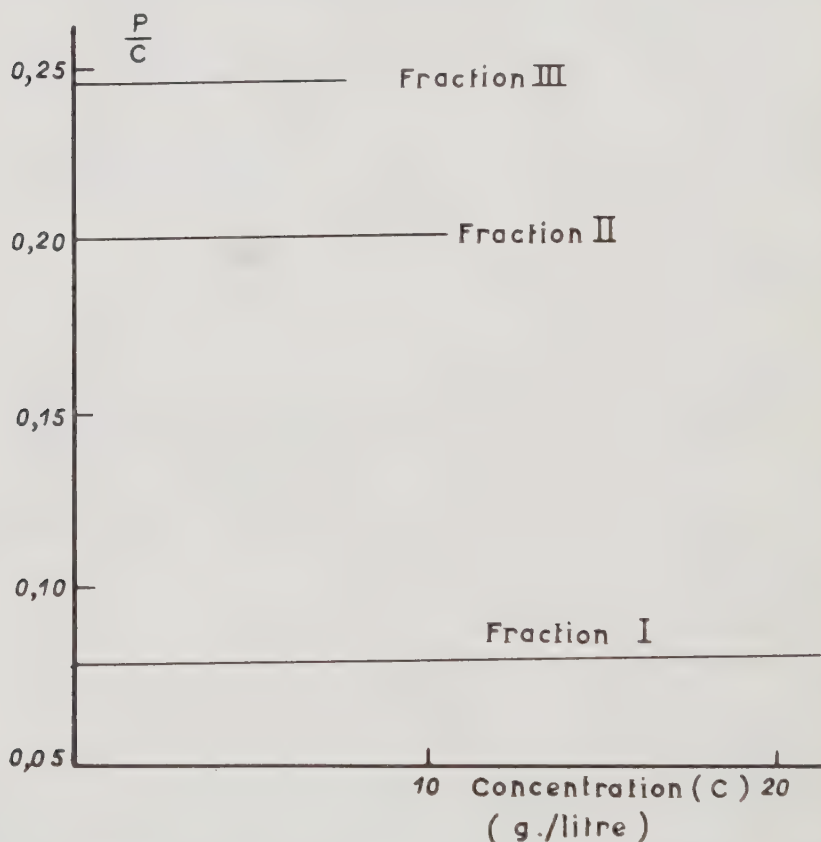


Fig. 15. — Variation du rapport p/c en fonction de la concentration pour différentes fractions d'apoferritine obtenues par fractionnement par le sulfate d'ammonium.

4° DISCUSSION DES RÉSULTATS.

L'étude des pressions osmotiques montre que :

— Les valeurs de p/c sont beaucoup plus fortes pour l'apoferritine que pour la ferritine.

TABLEAU XVIII

Fraction	Concentration (g p. litre)	Pression osmotique mesurée p (en cm d'eau)	$\frac{p}{c}$
1 SO ₄ (NH ₄) ₂ à 30 p. 100	21.0	1,75	0,083
	15.0	1.22	0,081
	9.0	0.72	0,079
	4.0	0,31	0,078
2 SO ₄ (NH ₄) ₂ à 32 p. 100	11.2	2.40	0,209
	6.2	1.32	0,209
	3.0	0.63	0,210
3 SO ₄ (NH ₄) ₂ à 37 p. 100	7.4	1.83	0,246
	4.3	1.05	0,245

— Les valeurs de p/c des différentes fractions d'apoferritine sont très différentes entre elles, tandis que celles des fractions de ferritine sont du même ordre.

De plus, les résultats se prêtent au calcul des masses moléculaires des différentes fractions étudiées, ce qui nous permettra d'apprécier la nature de l'hétérogénéité de la ferritine et de l'apoferritine.

a) Calcul des masses moléculaires à partir des mesures osmotiques.

Ce calcul s'effectue simplement à partir des valeurs expérimentales de $\frac{p}{c}$ par application de la relation de VAN T'HOFF.

$$M = g. R. T. \frac{1}{\frac{p}{c}}$$

Avec R = 0,083
T = 293° K
c = concentration protéique en g/litre

p = pression osmotique en cm d'eau = $\frac{p}{1.033,6}$ atmosphères

g = coefficient osmotique (que nous prendrons égal à 1).

Soit :

$$M = 25.140 \frac{1}{\frac{p}{c}}$$

Le rapport p/c n'étant généralement pas constant lorsque la concentration varie, on prend, pour le calcul de la masse moléculaire, la valeur limite vers laquelle tend ce rapport lorsque la concentration tend vers zéro. Les valeurs limites de p/c pour les différents échantillons étudiés se déduisent facilement des graphiques 14 et 15. Nous les avons groupées dans le Tableau XIX.

TABEAU XIX

Fe/N	Valeurs limites de $\frac{p}{c}$	M (calculé)
2,25	0,050	503.000
1,80	0,051	493.000
Ferritine 1,12	0,057	441.000
0,53	0,068	369.000
0 Frac. 1	0,078	322.000
Apoferritine 0 « 2	0,209	120.000
0 « 3	0,245	102.000

b) Hétérogénéité de la ferritine.

Nous savons que la molécule de ferritine doit être considérée comme résultant de l'association d'une partie minérale et d'une partie protéique dont le rapport des masses (qu'exprime le rapport Fe/N) est inconstant. A priori, nous ne savons pas si cette inconstance provient de la variation de l'une ou de l'autre de ces deux parties, ou des deux simultanément. Or, à partir des résultats précédents, il est possible de calculer les masses, relatives à une molécule, de chacune de ces deux parties.

— La masse m_1 de la partie minérale d'une molécule de ferritine de masse M et dont la teneur en fer est de X p. 100 est :

$$m_1 = \frac{36}{22} \cdot X \cdot M$$

puisque, ainsi que nous l'avons déjà indiqué, le complexe minéral représente environ 36 p. 100 de la masse d'un échantillon de ferritine de teneur en fer égale à 22 p. 100.

— La masse m_2 de la partie protéique est donc :

$$m_2 = M - m_1$$

Les valeurs de M , m_1 et m_2 sont indiquées dans le Tableau XX :

TABLEAU XX

Teneur en fer	Masse moléculaire	Masse de la partie minérale	Masse de la partie protéique
X p. 100	M	m_1	$m_2 = M - m_1$
22	503.000	181.000	503.000 - 181.000 = 322.000
18	495.000	148.000	495.000 - 148.000 = 347.000
12	441.000	87.000	441.000 - 87.000 = 354.000
5	369.000	30.000	369.000 - 30.000 = 339.000

Nous voyons ainsi que la molécule de ferritine est constituée d'une partie protéique de masse pratiquement constante dont la valeur moyenne est, d'après les chiffres du tableau XX, égale à :

$$\frac{322.000 + 347.000 + 354.000 + 339.000}{4} = 340.500$$

et d'une partie minérale de masse variable suivant la teneur en fer de l'échantillon considéré.

Il apparaît donc que *l'hétérogénéité de la ferritine est entièrement due à sa partie minérale.*

c) Hétérogénéité de l'apoferritine.

Les résultats du tableau XIX montrent que l'apoferritine est formée de molécules de masses différentes. C'est donc une protéine polydispersée.

La masse moléculaire calculée à partir des mesures osmotiques pour la fraction I de l'apoferritine ($M = 322.000$) correspond très sensiblement à la valeur moyenne de la masse de la partie protéique de la molécule de ferritine ($M = 340.500$).

Les molécules constituant les autres fractions, de masses plus faibles et qui n'existent pas dans la molécule de ferritine, seraient donc le résultat d'une destruction partielle de l'édifice protéique consécutive à l'élimination du fer. Cette destruction partielle n'empêche nullement la cristallisation par le sulfate de cadmium et ne modifie en rien les caractères des cristaux.

CONCLUSION

Ainsi, deux faits sont mis en évidence :

1^o La stabilité d'un échantillon de ferritine est d'autant plus grande que sa teneur en fer est plus faible. Ce fait est en accord avec l'hypothèse selon laquelle le fer de la ferritine serait, lors de son élimination, remplacé par de l'eau : l'augmentation de la stabilité traduisant l'augmentation d'hydratation.

2^o L'élimination « in vitro » du fer provoque, tout au moins dans certaines conditions, un fractionnement de la partie protéique de la molécule de ferritine. Cela suggère à nouveau l'hypothèse de la participation du fer à la structure secondaire de la molécule de ferritine, puisque son élimination provoque la destruction, tout au moins partielle, de l'édifice moléculaire.

ÉTUDE DE LA VISCOSITÉ DES SOLUTIONS DE FERRITINE ET D'APOFERRITINE

1° RELATION ENTRE VISCOSITÉ ET HYDRATATION.

On sait que l'écoulement d'une solution protéique, ou plus généralement d'une suspension, à travers un tube capillaire, ne suit pas la loi de HAGEN-POISEUILLE, mais dépend, ainsi que l'a montré EINSTEIN [47] :

- de la forme des particules,
- et, dans le cas où les particules sont assimilables à des sphères, du volume Φ occupé par la phase dispersée dans l'unité de volume (1 litre) de la solution.

Entre la viscosité relative et ce volume Φ on a alors la relation :

$$\eta_r = 1 + K \Phi \quad (1)$$

ou encore,

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 = K \Phi \quad (2)$$

avec :

$$\begin{aligned} \eta_r &= \text{Viscosité relative} \\ \eta_{sp} &= \text{Viscosité spécifique} \\ K &= \text{Constante.} \end{aligned}$$

Dans le cas théorique envisagé par EINSTEIN, la constante K est égale à 0,0025.

La relation précédente (2) n'est pas directement accessible à l'expérience. Aussi STAUDINGER et HUSEMANN [48] l'ont-ils transformée en faisant intervenir la masse spécifique ρ et la concentration c (exprimée en g/litre) du corps en solution, ces deux grandeurs étant reliées au volume Φ par la relation :

$$c = \rho \Phi \quad (3)$$

$$\text{D'où en portant dans (2) : } \eta_{sp} = K \frac{c}{\rho}$$

$$K = \frac{\eta_{sp}}{c} \rho \quad (4)$$

La constante K est souvent appelée *nombre de viscosité corrigé*.

Pour des suspensions à particules sphériques, telles par exemple que des suspensions de Gomme-Gutte, on trouve pour K une valeur voisine de la valeur théorique (de 0,0023 à 0,0027). Mais, dans de très nombreux cas, les valeurs expérimentales sont assez éloignées de la valeur théorique. On explique ces écarts de deux façons :

a) Les particules ne sont pas sphériques mais plus ou moins allongées et l'écart observé traduit l'asymétrie des particules.

b) Les particules sont hydratées (solvatées) et leur volume est plus grand qu'à l'état solide.

Dans ces deux cas, le rapport $\frac{K \text{ expérimental}}{K \text{ théorique}}$ est plus grand

que l'unité, et représente donc, soit l'allongement des particules (coefficient d'asymétrie), soit leur hydratation (solicitation volumétrique).

Nous voyons ainsi comment l'étude de la viscosité des solutions de ferritine et d'apoferritine peut nous renseigner sur leur état d'hydratation.

2° TECHNIQUES UTILISÉES :

Les mesures de viscosité ont été réalisées avec un viscosimètre d'Ostwald à la température de 26°, à partir de solutions, de ferritine et d'apoferritine (préparées comme nous l'avons déjà indiqué).

Les concentrations des solutions ont été déterminées par dosage de l'azote protéique en admettant que l'apoferritine contient 15 p. 100 d'azote et la ferritine 10 p. 100.

Les densités des solutions ont été déterminées à partir des courbes expérimentales $d = f(c)$ construites au préalable.

Enfin les masses spécifiques de la ferritine et de l'apoferritine ont été déterminées par pesée du résidu sec correspondant à un volume connu d'une solution de concentration connue (voir annexe). Nous avons trouvé :

$\rho_f = 1,70$ pour la ferritine utilisée.

$\rho_a = 1,34$ pour l'apoferritine

3° RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

La fig. 16 représente les variations de la viscosité relative en fonction des concentrations protéiques pour la ferritine et l'apoferritine.

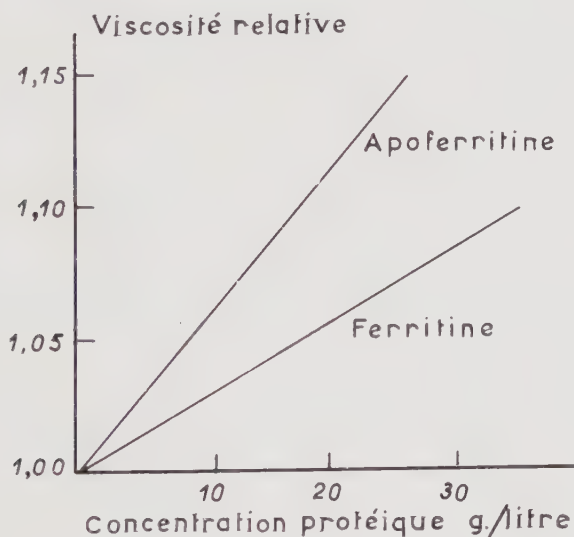


Fig. 16. — Variation de la viscosité relative en fonction de la concentration protéique exprimée en g/l.

On observe que, pour ces deux protéines, la fonction $\eta_r = f(c)$ est linéaire, ce qui signifie que ferritine et apoferritine se comportent comme des sphéro-colloïdes et que l'on peut leur appliquer la relation (1) :

$$\eta_r = 1 + K \cdot \Phi$$

La fig. 17 représente les variations de la viscosité relative en fonction, non plus des concentrations protéiques, mais de la teneur en azote, ce qui équivaut, en somme, à augmenter de 20 p. 100 la concentration des solutions de ferritine. On observe, dans ces conditions, que les deux droites du graphique se rapprochent mais que l'apoferritine reste, cependant, plus visqueuse que la ferritine. Cette représentation a l'avantage de rapporter les variations de la viscosité à la fraction protéique que la ferritine et l'apoferritine ont en commun.

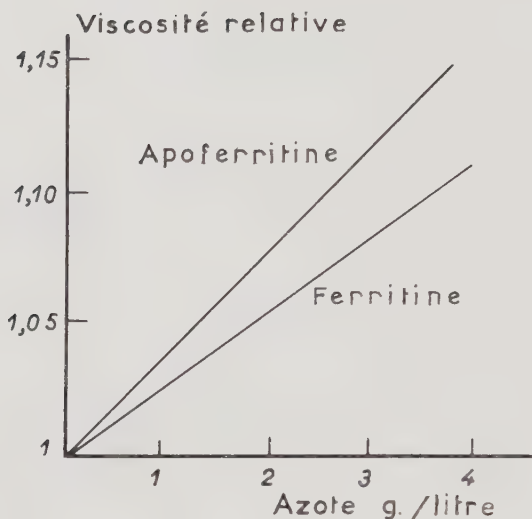


Fig. 17. — Variation de la viscosité relative des solutions de ferritine et d'apoferritine en fonction de la concentration exprimée en g d'azote par litre.

Le tableau XXI rend compte des données expérimentales et des valeurs des nombres de viscosité corrigé $\frac{\eta_{sp}}{c} \cdot \rho$ relatif aux différentes concentrations. De ce tableau il ressort que les valeurs moyennes de $K = \frac{\eta_{sp}}{c} \rho$ sont respectivement égales à :

- $4,9 \cdot 10^{-3}$ pour la ferritine
- $8 \cdot 10^{-3}$ pour l'apoferritine

Ainsi que nous l'avons indiqué précédemment, les rapports :

$\frac{K \text{ expérimental}}{K \text{ théorique}}$, égaux à :

$K \text{ théorique}$

$$\frac{4,9 \cdot 10^{-3}}{2,5 \cdot 10^{-3}} = 1,96 \text{ pour la ferritine}$$

$$\frac{8 \cdot 10^{-3}}{2,5 \cdot 10^{-3}} = 3,2 \text{ pour l'apoferritine}$$

représentent soit l'asymétrie, soit l'importance de l'hydratation des molécules de ces protéines.

TABLEAU XXI

FERRITINE

<i>Azote g/l</i>	<i>Protéine g/l</i>	η_r	$\frac{\eta_{sp}}{c} \cdot 10^3$
3	30	1,091	5,1
2,5	25	1,070	4,76
2,28	22,8	1,065	4,84
2,0	20	1,056	4,76
1,5	15	1,039	4,42
1,0	10	1,030	5,1
0,84	8,4	1,027	5,4
0,5	5	1,014	4,70

APOFERRITINE

<i>Azote g/l</i>	<i>Protéine g/l</i>	η_r	$\frac{\eta_{sp}}{c} \cdot 10^3$
3,47	23	1,140	8,14
3,0	20	1,119	7,97
2,62	17,5	1,100	7,67
2,10	14	1,081	7,74
1,5	10	1,060	8,04
0,9	6	1,038	8,48
0,7	4	1,025	8,33

Il semble difficile, à priori, de connaître la signification de l'écart observé pour ce rapport entre la ferritine et l'apoferritine. Cependant certains faits tels que l'isomorphisme cristallin, l'identité des diagrammes de diffraction des rayons X et l'identité des propriétés immunologiques de ces substances permettent de préciser que l'origine de cet écart réside dans l'hydratation relative de l'apoferritine par rapport à la ferritine puisqu'ils impliquent une identité structurale entre les molécules de ferritine et d'apoferritine.

Remarquons que les données précédentes nous permettent simplement de préciser que l'écart existant entre les valeurs du rapport K expérimental/ K théorique (1,96 pour la ferritine et 3,2 pour l'apoferritine) ne peut s'expliquer que par une différence d'hydratation, mais ne nous permet pas de savoir si la molécule de ferritine est hydratée ou asymétrique. Cependant nous savons depuis les travaux de ROTHEN [14] que la molécule d'apoferritine n'est pas sphérique, mais ellipsoïdale, avec un rapport des axes de 1/3 (mesuré par l'étude de la sédimentation), de telle sorte que l'asymétrie moléculaire intervient certainement dans l'augmentation observée de la viscosité par rapport à la valeur théorique déduite de la théorie d'EINSTEIN : mais rien ne permet de dire que, pour la ferritine, ce facteur est seul en cause.

Par conséquent, les mesures de viscosité apportent une nouvelle confirmation à l'hypothèse d'une hydratation relative de l'apoferritine par rapport à la ferritine.

Dans le but de préciser davantage cette notion, nous avons essayé de calculer à partir des résultats précédents la quantité d'eau que peut fixer une quantité donnée d'apoferritine ; voici le principe de ce calcul :

4° CALCUL DE L'HYDRATATION DE L'APOFERRITINE.

Les équations d'EINSTEIN s'écrivent, pour la ferritine et l'apoferritine :

$$\eta_{sp_f} = 0,0049 \cdot \frac{c}{\rho_f}$$

$$\eta_{sp_a} = 0,008 \cdot \frac{c}{\rho_a}$$

ou encore :

$$\eta_{sp_f} = 0,0025 \cdot K' \cdot \frac{c}{\rho_f}$$

$$\eta_{sp_a} = 0,0025 \cdot K'' \cdot \frac{c}{\rho_a}$$

avec :

$$\begin{aligned} K' &= 2 \\ K'' &= 3,2 \end{aligned}$$

Les quantités $K' \cdot \frac{c}{\rho_f}$ et $K'' \cdot \frac{c}{\rho_a}$ correspondent aux volumes occupés par la ferritine (V_f) et l'apoferritine (V_a) en solution.

Si l'on prend comme masses spécifiques celles des substances anhydres ($\rho_f = 1,70$ et $\rho_a = 1,34$), $\frac{c}{\rho_f} = \phi'_f$ et $\frac{c}{\rho_a} = \phi'_a$ sont les volumes occupés par la ferritine et l'apoferritine anhydres dans 1 litre de solution. Les constantes K' et K'' représentent alors des facteurs correctifs dépendant de l'asymétrie et de l'hydratation de ces substances.

On a :

$$\begin{aligned} V_f &= K' \cdot \frac{c}{\rho_f} = 2 \cdot \frac{c}{1,70} \\ V_a &= K'' \cdot \frac{c}{\rho_a} = 3,2 \cdot \frac{c}{1,34} \\ \frac{V_f}{V_a} &= \frac{K'}{K''} \cdot \frac{\rho_a}{\rho_f} = \frac{2 \cdot 1,34}{3,2 \cdot 1,70} = 0,50 \end{aligned}$$

Donc :

$$V_f = 0,50 \cdot V_a \quad (5)$$

Le volume V_a est composé des volumes de la fraction protéique (V_{a1}) et de l'eau d'hydratation (V_{a2}).

De même, le volume V_f est composé des volumes de la fraction protéique ($V_{f1} = V_{a1}$) et du complexe ferrique (V_{f2}). (*)

Soit :

$$\begin{aligned} V_a &= V_{a1} + V_{a2} \\ V_f &= V_{a1} + V_{f2} \end{aligned}$$

En portant dans (5) on a :

$$V_{a1} + V_{f2} = 0,5 \cdot V_a \quad (6)$$

(*) Nous ne faisons pas intervenir un troisième terme V_{f3} représentant l'eau d'hydratation de la ferritine. En effet, à supposer qu'il ne soit pas négligeable, ce terme est commun à la ferritine et à l'apoferritine. Nous sommes donc en droit de considérer qu'il est compris dans les termes $V_{f1} = V_{a1}$

Détermination de V_{f_2} en fonction de V_{a_1} .

En rapportant V_{a_1} et V_{f_2} à une masse de ferritine égale à 1 g on a :

$$\frac{1}{V_{f_2} + V_{a_1}} = 1,70$$

d'où $V_{a_1} \cdot 1,34 = 0,64$

$$V_{a_1} = \frac{0,64}{1,34} = 0,48$$

Donc :

$$V_{f_2} = \frac{1}{1,70} - 0,48 = 0,10$$

$$\frac{V_{f_2}}{V_{a_1}} = \frac{0,10}{0,48} = 0,2$$

$$V_{f_2} = 0,2 \cdot V_{a_1}$$

En portant dans (6) il vient :

$$V_{a_1} + 0,2 \cdot V_{a_1} = 0,5 \cdot V_a$$

$$\frac{V_{a_1}}{V_a} = \frac{0,5}{1,2} = 0,42$$

Ce qui revient à dire que le volume de l'apoferritine est réparti entre :

La fraction protéique qui en représente : 42 p. 100

L'eau d'hydratation qui en représente : 58 p. 100

Mais il est préférable de donner ce pourcentage non par rapport au volume, mais par rapport au poids.

En négligeant l'effet d'électrostriction, c'est-à-dire en supposant que la totalité de l'eau d'hydratation a la même densité (ce qui, selon J. T. Elsal, " n'est pas exactement vrai, mais correspond probablement à une raisonnable approximation ") on peut écrire :

$$42 \cdot 1,34 = 56,3 = \text{masse de la fraction protéique}$$

$$58 \cdot 1 = 58 = \text{masse de l'eau d'hydratation}$$

d'où :

$$\frac{\text{masse de l'eau d'hydratation}}{\text{masse de la fraction protéique}} = \frac{58}{56,3} = 1,03$$

Ainsi, l'apoferritine serait capable de fixer sensiblement 1 g d'eau par g de protéine anhydre.

ÉTUDE DE LA DESHYDRATATION

PAR LA CHALEUR

INTRODUCTION

Il est très vraisemblable qu'une partie au moins de l'eau des solutions protéiques et des gels possède, du fait de liaisons d'ailleurs mal définies, contractées avec la molécule protéique, des caractères distincts de l'eau ordinaire telle que nous la manipulons. On rappellera pour mémoire l'expérience de HATSCHECK montrant qu'en mélangeant un gel concentré de gélatine avec un sel de cobalt anhydre, donc bleu, on n'obtient pas la couleur rose caractéristique des sels de cobalt hydratés, attestant ainsi une sorte de dissimulation de l'eau dans le gel de gélatine.

Les termes ne manquent pas pour définir (ou tenter de définir) l'état de l'eau dans les gels.... Le terme d'eau fixée est le plus vague, nous l'adopterons faute de mieux. Les conceptions admises sur l'état de l'eau dans les systèmes colloïdaux suggèrent d'ailleurs qu'il n'y aurait pas de démarcation nette entre l'eau libre et l'eau non libre; on peut même supposer une gradation insensible entre les molécules d'eau ayant l'activité normale de l'eau pure et celles pour lesquelles cette activité est si réduite que ces molécules sont devenues partie intégrante du solide qui les retient. Une telle interprétation est d'ailleurs en accord avec la structure dipolaire de l'eau; celle-ci permet aux molécules d'eau de subir les influences électriques de sorte que les granules colloïdaux dits hydrophiles (de par les groupements chimiques polaires qu'ils contiennent) peuvent s'entourer d'une couronne (ou mieux d'une enveloppe) de molécules d'eau au sein de laquelle les dipôles d'eau sont de plus lâchement retenus par influence électrique; il en résulte qu'au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la périphérie du granule, l'orientation des dipôles est de moins en moins régulière. Le problème le plus délicat est de savoir si l'on doit établir une discrimination entre la couche d'eau

solidement retenue à la surface du granule, avec une orientation précise des dipôles due à l'intensité des attractions électriques et l'enveloppe aqueuse au sein de laquelle les mêmes dipôles ont une orientation de plus en plus désordonnée et sont de moins en moins solidement retenus.

Le travail exposé ci-après a pour but de mettre en évidence, par l'étude de la déshydratation ménagée (à température modérée), l'existence de plusieurs fractions d'eau inégalement retenues par les protéines. On peut, en effet, s'attendre à ce qu'une fraction donnée d'eau d'hydratation s'évapore avec une vitesse d'autant plus petite qu'elle est plus fortement liée à la protéine.

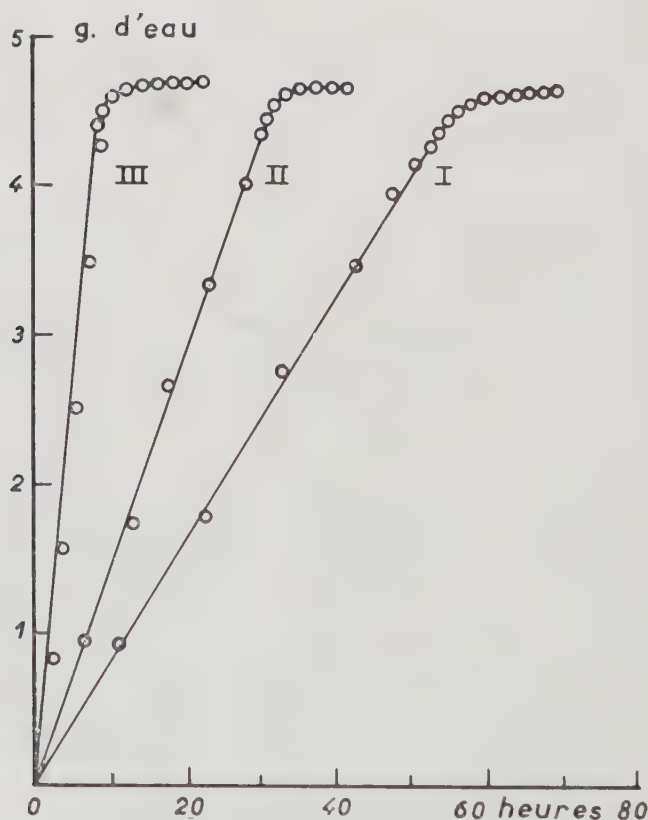


Fig. 18. — Deshydratation d'une solution de gélatine dans des pèses-filtres de surfaces différentes.

Courbe I : Surface d'évaporation = 3,8 cm₂

Courbe II : — — — = 6,15 cm₂

Courbe III : — — — = 23,75 cm₂

Dans un premier temps nous avons effectué des expériences préliminaires en étudiant la deshydratation ménagée de solutions de gélatine, choisie en raison de sa grande affinité pour l'eau et, dans un deuxième temps, à la lumière des données expérimentales acquises, nous avons étudié, dans les mêmes conditions, les solutions de ferritine et d'apoferritine.

1^o ÉTUDE PRÉLÉMINAIRE DE LA GÉLATINE — ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA DÉSHYDRATATION A TEMPÉRATURE MODÉRÉE D'UNE SOLUTION DE GÉLATINE.

a) Résultats expérimentaux.

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

On prépare un gel en dissolvant un poids de gélatine Prolabo en poudre dans 100 ml d'eau à 70-80°, de façon à obtenir une pseudo-solution opalescente ne contenant pas de particules visibles en suspension.

Par refroidissement, on obtient un gel. Un poids de l'ordre de 5 g est prélevé dans un pèse filtre, et l'on suit la deshydratation en fonction du temps à la température de 36° ($p = 760$ mm de mercure) jusqu'à obtention d'un poids constant. Le graphique 18 représente la deshydratation de la même solution (à cette température on a, non un gel, mais une solution) dans trois pèses-filtres de sections différentes.

L'examen des trois courbes suggère les remarques suivantes :

1^o Dans les trois cas, on distingue une portion rectiligne ascendante puis une portion incurvée et un palier (courbe de type exponentiel). (Voir fig. 18 et 19).

2^o Les pentes respectives des parties rectilignes dépendent uniquement de la surface d'évaporation, ainsi qu'il ressort des chiffres ci-dessous.

TABLEAU XXII

	Pente de la courbe (P)	Surface d'évaporation (S)	Rapport $\frac{P}{S}$
Courbe 1	0,09	3,80 cm ²	$2,37 \cdot 10^{-2}$
Courbe 2	0,15	6,15 cm ²	$2,43 \cdot 10^{-2}$
Courbe 3	0,49	23,75 cm ²	$2,1 \cdot 10^{-2}$

Le rapport $\frac{P}{S}$ étant constant, la vitesse de déshydratation pendant la première phase (parties rectilignes des courbes) dépend, comme on pouvait s'y attendre, de la surface d'évaporation. Mais, quelle que soit la surface du pèse-filtre utilisé, la quantité d'eau qui subit un ralentissement à l'évaporation (parties incurvées des courbes) est la même pour une solution donnée de gélatine. Ainsi, pour les 3 courbes du graphique 18 cette quantité d'eau est égale à 55 mg (pour un résidu sec de 132 mg).

b) *Cinétique de la déshydratation.*

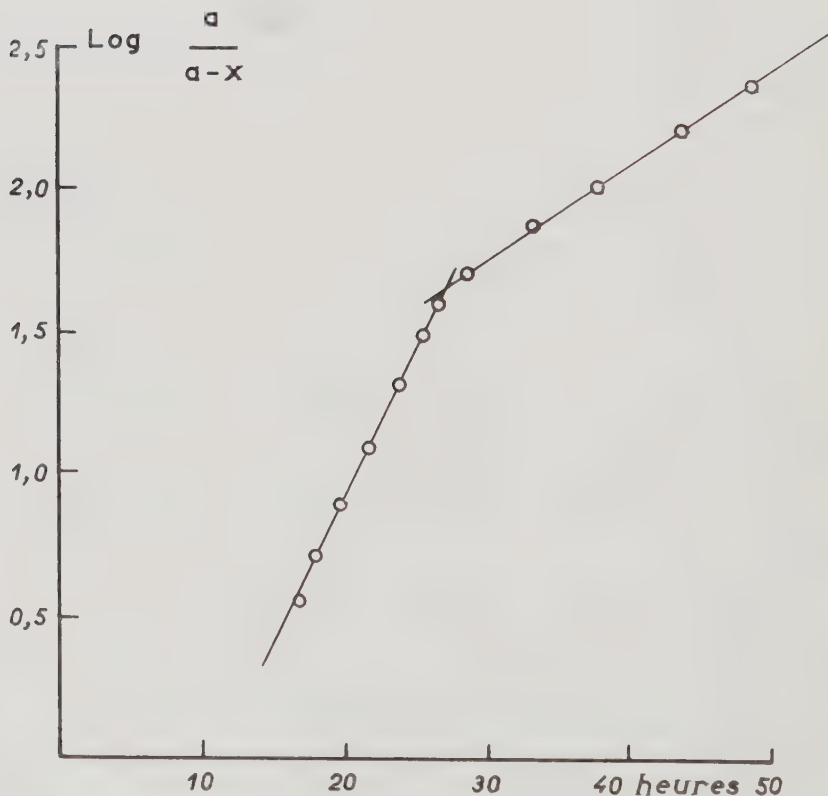


Fig. 19. — Représentation en coordonnées semi-logarithmiques de la déshydratation d'une solution de gélatine.

Nous considèrerons le phénomène physique de déshydratation comme une réaction du premier ordre.

Soit $\frac{dx}{dt}$ la vitesse de déshydratation.

A l'instant $t = 0$	H_2O dans le gel = a
	H_2O libérée = 0
A l'instant t	H_2O libérée = x
	H_2O dans le gel = $a - x$

La vitesse étant à chaque instant proportionnelle à la quantité d'eau restant à évaporer :

$$\frac{dx}{dt} = k (a - x)$$

d'où :

$$\text{Log } \frac{a}{a - x} = k t$$

On porte en abscisse t et en ordonnée $\text{Log } \frac{a}{a - x}$ (graphique 19).

Les points se situent *non sur une droite, mais sur deux droites* de pentes différentes, k_1 et k_2 .

Les deux constantes k_1 et k_2 caractérisent la déshydratation, ce qui signifie qu'une certaine fraction de l'eau de la solution s'évapore à une vitesse plus faible.

Si la totalité de l'eau était éliminée à la même vitesse on aurait :

$$k_1 = k_2 \quad \text{ou} \quad \frac{k_1}{k_2} = 1$$

Plus $\frac{k_1}{k_2}$ est élevé, plus lente est la déshydratation de la seconde fraction par rapport à la première. Selon les conditions expérimentales (section du pèse filtre, concentration en gélatine, température d'évaporation), le rapport $\frac{k_1}{k_2}$ varie.

On peut donc penser qu'une certaine fraction de l'eau d'une solution de gélatine est plus solidement retenue, ce qui ne préjuge d'ailleurs pas de la nature des liaisons.

La représentation précédente permet d'avoir une idée de la quantité d'eau dont l'évaporation est plus lente. Le principe de la détermination est le suivant : on calcule la masse du résidu sec après traitement prolongé à 110° : (m). Les graphiques permettent de déterminer les quantités d'eau (m_1 et m_2) qui s'évaporent avec des vitesses dont les constantes sont k_1 et k_2 .

D'où $\frac{m_1}{m}$ = eau fixée par g. de gélatine sèche et s'évaporant avec

une constante de vitesse k_1 et $\frac{m_2}{m}$ = g. d'eau fixée par g de gélatine

sèche et s'évaporant avec une constante de vitesse k_2 . Les tableaux XXIII et XXIV indiquent que le poids d'eau fixé (en valeur absolue) pour une même prise d'essai est proportionnel à la concentration en gélatine (fig. 20), ou, ce qui en revient au même, que le poids d'eau fixé par g de gélatine est constant. m_1 représente environ 0,15 g d'eau et m_2 0,25 g d'eau par g de gélatine sèche. Cet ensemble, soit 0,40 g d'eau par g de gélatine sèche, subit un ralentissement à l'évaporation.

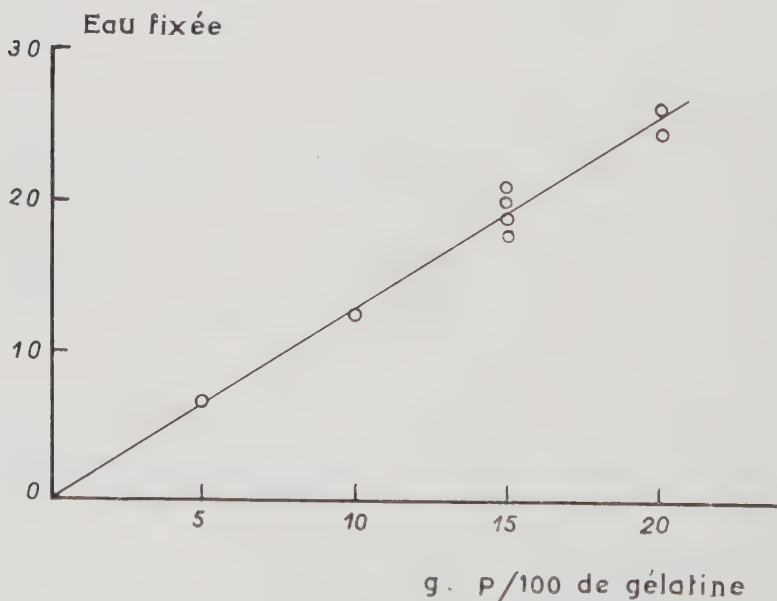


Fig. 20. — Variation de la quantité d'eau fixée par la gélatine en fonction de la concentration.

TABLEAU XXIII

N ^o	Poids de gélatine sèche : m	m_1	m_2
1	0,3168 g.	0,05 g.	0,09 g.
2	0,4868	0,06	0,13
3	0,7368	0,12	0,22
4	0,7879	0,12	0,18
5	0,9177	0,14	0,20
6	0,9269	0,12	0,21
7	1,00	0,15	0,24
8	1,00	0,14	0,27

TABLEAU XXIV

	Concentration de la gélatine en g p. 100	$\frac{m_1}{m}$	$\frac{m_2}{m}$
1	5	0,15	0,28
2	10	0,13	0,27
3	15	0,16	0,30
4	15	0,15	0,23
5	15	0,14	0,22
6	15	0,12	0,23
7	20	0,15	0,24
8	20	0,14	0,27

DISCUSSION DES RÉSULTATS PRÉCÉDENTS

Un fait est acquis : la totalité de l'eau des solutions de gélatine n'a pas le même comportement vis-à-vis de la déshydratation à température modérée (30 à 50°). Cela résulte de l'inégalité des pentes des deux droites lorsque la cinétique est représentée en notations logarithmiques.

À titre comparatif, et afin de fixer les idées, nous avons étudié dans les mêmes conditions la cinétique de l'évaporation de l'eau pure ainsi que les déshydratations de solutions de chlorure de sodium, de chlorure de potassium et de sulfate de cuivre (graphique 21).

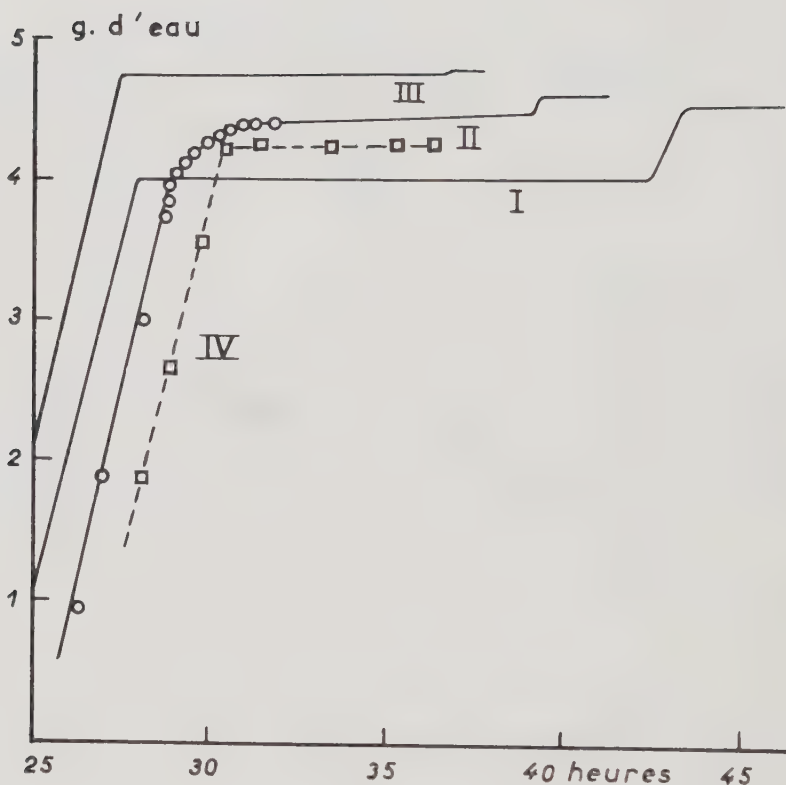


Fig. 21. — Déshydratation à température modérée de solutions de gélatine, de chlorure de sodium, de chlorure de potassium et de sulfate de cuivre.

Courbe I : sulfate de cuivre
 Courbe II : gélatine
 Courbe III : chlorure de sodium
 Courbe IV : chlorure de potassium.

Pour les 3 sels, il n'y a pas d'incurvation des courbes comparable à ce que l'on obtient avec la gélatine. La portion incurvée de la courbe de déshydratation de la gélatine est remplacée par un point anguleux après lequel on obtient des paliers régulièrement horizontaux.

Par contre, si, au bout d'un temps suffisamment long, on élève brutalement la température (110°) on fait les constatations suivantes :

— Pas de modifications de poids du pèse filtre qui contenait l'eau pure.

— Diminution de poids insignifiante dans le cas de ClK.

- Diminution légèrement plus importante dans le cas de CINa .
- Diminution très nette dans le cas du sulfate de cuivre.

Le cas de ce dernier sel est particulièrement intéressant, car il contient de l'eau de cristallisation et on connaît les expériences de NICLOUX (55) qui, au moyen de dosage d'éthanol dans les eaux mères de cristallisation du sulfate de cuivre, a pu montrer que l'eau de cristallisation pouvait être assimilée à une partie de l'eau fixée par les protéines,

Ainsi, les solutions de gélatine, au cours de leur déshydratation s'écartent des solutions salines par la *continuité* de la courbe représentative, s'opposant à la discontinuité de la courbe représentant le phénomène pour les sels (graphique 21).

D'autre part, l'expérience montre qu'une telle température même maintenue indéfiniment, ne peut assurer l'élimination complète de l'eau retenue par la gélatine. On constate en effet, que lorsque le palier tel que celui du graphique 21 est atteint à 37° , indiquant un poids constant, le passage brusque à une température élevée (de l'ordre de 110°) provoque une dénivellation, attestant qu'une dernière fraction de l'eau, encore fixée sur la gélatine, résiste à la température de 37° quel que soit le temps pendant lequel on la maintient.

Ainsi, la gélatine se rapproche d'un sel contenant de l'eau de cristallisation, tel que le sulfate de cuivre, par l'impossibilité où l'on se trouve d'éliminer la totalité de l'eau à température modérée.

L'eau des solutions de gélatine se présenterait alors de la façon suivante :

1^o A la première portion linéaire de la courbe de déshydratation (comparable à ce que l'on observe pour l'eau pure) correspond de l'eau « solvante » non liée à la gélatine.

2^o Une deuxième fraction (0,10 à 0,15 g par g. de gélatine), qui correspond au début de la portion incurvée de la courbe, ou si l'on préfère, à la première droite de pente k_1 en coordonnées logarithmiques, différente de l'eau solvante, serait liée à la gélatine.

3^o Une troisième fraction (0,20 à 0,25 g par g de gélatine), qui correspond à la deuxième droite de pente k_2 et qui résiste davantage à la déshydratation, serait encore de l'eau liée à la gélatine.

4^o Enfin, une quatrième et dernière fraction (de 0,01 à 0,05 g par g de gélatine) nécessite pour son évaporation une température élevée.

Ces résultats s'expliquent assez facilement si l'on admet avec SPONSLER qu'il existe pour les protéines deux types d'hydratation

1^o Hydratation résultant de la fixation coordinative d'eau sur les groupements polaires des chaînes latérales d'amino-acides. Les acides aminés susceptibles d'intervenir dans ce mécanisme sont essentiellement : la sérine, la thréonine, l'hydroxyproline, la tyrosine, le tryptophane, l'histidine, la lysine, l'arginine, l'acide aspartique, l'acide glutamique et l'acide hydroxyglutamique.

2° Hydratation résultant de la fixation coordinative d'eau sur les groupements : CO = et NH = de l'épine dorsale.

Ne peut-on penser que les fractions d'eau qui s'évaporent avec des vitesses dont les constantes sont k_1 et k_2 correspondent à ces deux types d'hydratation? La première fraction, qui s'évapore le plus facilement (constante de vitesse k_1), serait superficielle, la deuxième, qui s'évapore plus difficilement (constante de vitesse k_2), serait moins superficielle et plus intensément liée à la trame de la molécule de gélatine.

2° ÉTUDE DE LA DÉSHYDRATATION A TEMPÉRATURE MODÉRÉE DE SOLUTIONS DE FERRITINE ET D'APOFERRITINE

En opérant dans les conditions expérimentales qui viennent d'être indiquées pour la déshydratation de la gélatine, nous avons fait les constatations suivantes en ce qui concerne la déshydratation ménagée des solutions de ferritine et d'apoferritine.

— Pour la ferritine comme pour l'apoferritine, la courbe représentative de la quantité d'eau évaporée en fonction du temps présente le même aspect général que pour la gélatine (fig. 22 et 23). Cependant, pour la ferritine, la portion incurvée est beaucoup plus courte et aplatie que pour la gélatine ou l'apoferritine.

— En coordonnées semi-logarithmiques, les courbes représentatives (correspondant aux zones incurvées des graphiques précédents) de la quantité $\log \frac{a}{a-x}$ en fonction du temps sont linéaires, comme le montrent les fig. 23 et 24. La déshydratation de ces protéines à température modérée est donc justiciable, comme dans le cas de la gélatine, d'une représentation exponentielle.

$$x = a - a \cdot e^{-k \cdot t}$$

Cependant, à la différence de ce que nous avons observé pour la gélatine, il n'existe *qu'une seule droite et non pas deux*: de plus la déshydratation de ces protéines est complète à 37°: en effet on n'observe pas de diminution sensible de la masse en portant les résidus secs à la température de 110°.

Puisque la totalité de l'eau fixée par la ferritine ou l'apoferritine se comporte de la même façon vis-à-vis de la déshydratation à tempé-

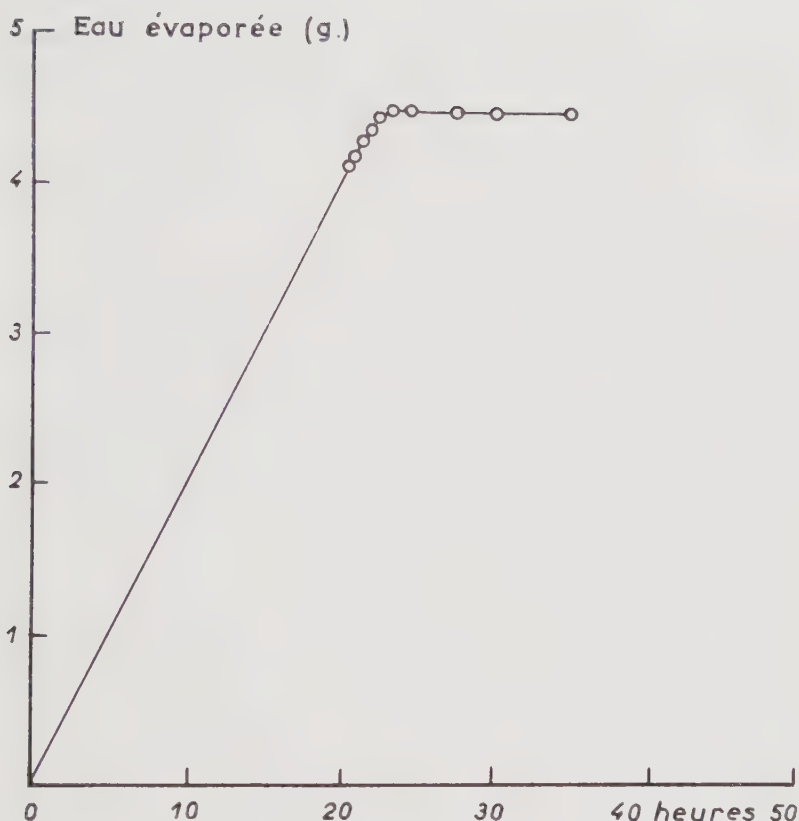


Fig. 22. — Déshydratation à température modérée d'une solution de ferritine.

rature modérée, il semble que l'on peut admettre qu'il n'y a qu'un seul type d'hydratation ou si l'on préfère que la totalité de l'eau d'hydratation est unie à l'apoferritine par des liaisons de même nature. Il est vraisemblable, du reste (si l'on admet le schéma de SPONSLER que nous avons indiqué précédemment concernant les deux mécanismes d'hydratation des protéines), qu'il s'agit ici d'une hydratation correspondant au premier type : fixation coordinative d'eau sur les groupements polaires des chaînes latérales. En effet, l'analogie est frappante avec la première fraction de l'eau retenue par la gélatine et qui s'évapore avec une constante de vitesse k_1 .

L'analyse plus précise des graphiques précédents donne quelques indications quantitatives. En effet, nous pouvons calculer la quantité d'eau par gramme de ferritine ou d'apoferritine, qui subit un ralentisse-

ment à l'évaporation. Nous avons ainsi trouvé, pour une ferritine de teneur en fer moyenne de 18 p. 100, que la quantité d'eau subissant un ralentissement à l'évaporation était sensiblement égale à 0,06 g par gramme de ferritine. Pour l'apoferritine, cette quantité est trouvée égale à 0,95 g par gramme d'apoferritine. (Voir Tableau XXV).

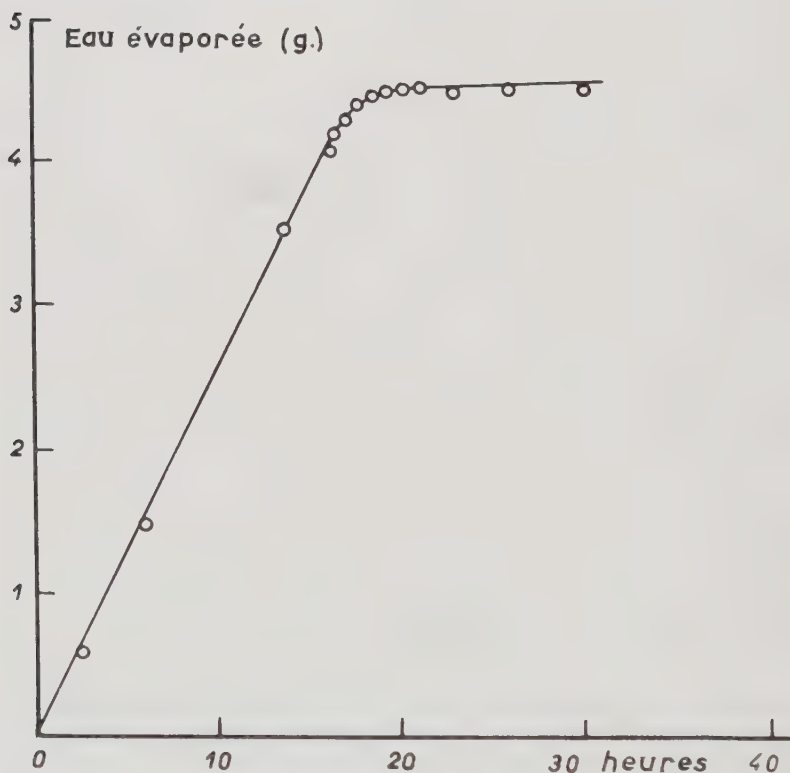


Fig. 23. — Déshydratation à température modérée d'une solution d'apoferritine.

Il est intéressant de noter qu'une masse donnée d'apoferritine est capable de provoquer le ralentissement à l'évaporation d'une masse sensiblement égale d'eau; ou si l'on préfère, que l'apoferritine renferme environ 50 p. 100 d'eau d'hydratation. Remarquons que ce chiffre est du même ordre que celui que nous avons pu calculer à partir des mesures de viscosité.

TABLEAU XXV

	<i>Ferritine</i> (18 % de fer)	<i>Apo ferritine</i>
Quantité d'eau s'évaporant suivant la loi exponentielle	0,0121 g	0,1621 g
Masse du résidu sec	0,1543 g	0,1710 g
Gramme d'eau retenu par gramme de protéine	0,06	0,95 g

Un élément, cependant, est discordant dans ces déterminations: la quantité d'eau que serait capable de fixer l'apoferritine est beaucoup plus importante que dans le cas de la gélatine (0,95 g contre 0,40), alors que, manifestement, la gélatine est capable de fixer davantage d'eau (formation de gels). Sans vouloir expliquer ce fait, ce qui serait

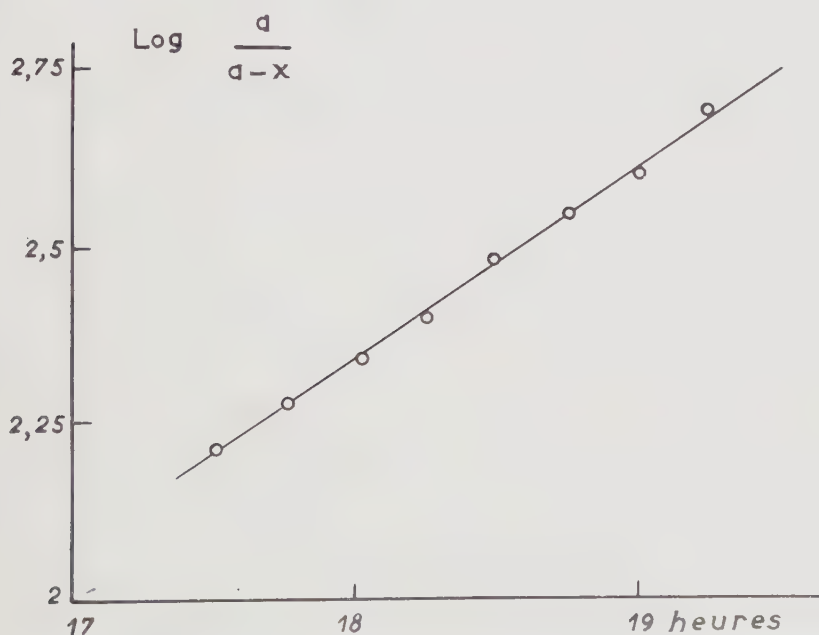


Fig. 21. — Représentation en coordonnées semi-logarithmiques de la déshydratation d'une solution d'apoferritine.

hors de sujet, remarquons cependant que si l'on peut comparer qualitativement les propriétés physico-chimiques de substances aussi différentes que la gélatine et l'apoferritine, on ne peut généralement pas

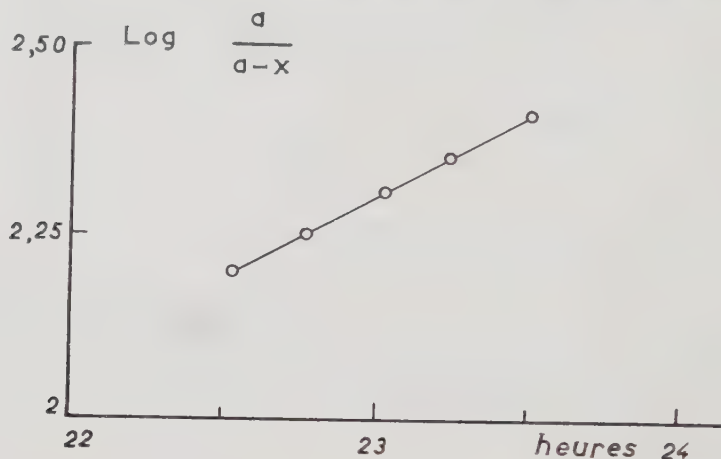


Fig. 25. — Représentation en coordonnées semilogarithmiques de la déshydratation d'une solution de ferritine.

rendre compte de ces propriétés par les mêmes lois (par exemple viscosité, pression osmotique...) du moins sans faire appel aux structures et liaisons par lesquelles une solution protéique se différencie d'un gel.

CHAPITRE IV

ÉTUDE CHROMATOGRAPHIQUE

DES ACIDES AMINÉS

DE LA MOLÉCULE D'APOFERRITINE

Nous avons entrepris l'étude chromatographique des produits d'hydrolyse totale de l'apoferritine, d'une part, en raison du peu de documentation existant actuellement sur la répartition des acides aminés dans la molécule d'apoferritine et, d'autre part, dans le but de voir si la composition en amino-acides de l'apoferritine peut nous renseigner sur le mécanisme de la fixation d'eau sur cette protéine.

La constitution de l'apoferritine est très mal connue. En effet, dans les quelques articles concernant la répartition des constituants de cette protéine, on note souvent des données contradictoires; ainsi pour KUHN [4] l'apoferritine contiendrait des acides nucléiques alors que GRANICK et MICHAELIS [18], se basant sur l'étude du spectre d'absorption ultra-violet, nient la présence de telles substances. Ces deux derniers auteurs signalent, en outre, que le spectre U.V. de l'apoferritine indique la présence de tryptophane.

Selon TRIA [3], l'azote total d'un hydrolysate de ferritine serait réparti entre l'arginine (11,4 p. 100), l'histidine (10,2 p. 100), la lysine (8,79 p. 100) et la proline (3,77 p. 100), le reste étant indéterminé. Mais en ce qui concerne l'arginine, notamment, l'accord n'est pas réalisé entre les différents auteurs. Cet acide aminé correspondrait à 26,5 p. 100 de l'azote total selon KUHN, à 18 p. 100 selon MAZUR, LITT et SHORR [25] et à 13,8 p. 100 selon ARCHIBALD [17], ces derniers auteurs ont par ailleurs identifié et dosé (méthode microbiologique, sur milieu de HENDERSON et SNELL) les 17 acides aminés suivants :

Acide glutamique, acide aspartique, arginine, histidine, lysine, cystéine, méthionine, tyrosine, phénylalanine, leucine, isoleucine, glycocolle, valine, alanine, thréonine, proline, tryptophane.

Signalons encore l'identification par KANAMORI et MOEDA [31] au moyen de la chromatographie de partage sur papier (système propanol-ligroïne) des 6 acides aminés suivants : alanine, glycocolle, méthionine, arginine, histidine et lysine (*).

Ainsi, en dehors des bases hexoniques (encore que quantitativement l'accord ne soit pas réalisé), du tryptophane et de la tyrosine qui sont caractérisés par le spectre d'absorption U.V. de l'apoferritine, aucun acide aminé constitutif de l'apoferritine n'est connu avec certitude.

Ce travail a pour but de préciser, au moins qualitativement, la répartition des acides aminés dans la molécule d'apoferritine.

TECHNIQUES UTILISÉES

Nous avons utilisé essentiellement la chromatographie de partage sur papier avec, comme solvant, le mélange butanol-acide acétique-eau (4-1-5) et le phénol ammoniacal (3 p. 100).

L'hydrolyse acide totale a été réalisée soit à partir d'apoferritine préparée selon GRANICK, soit à partir de ferritine. Dans ce dernier cas, la ferritine en solution est traitée par ClH N à l'ébullition pendant une minute afin de flocculer l'apoferritine et d'éliminer le fer. Le flocculat est alors séparé par filtration, lavé à plusieurs reprises jusqu'à ce que l'eau de lavage ne contienne plus de fer, puis remis en suspension dans de l'acide chlorhydrique à 20 p. 100 et porté à l'ébullition à reflux pendant 12 heures.

(*) A notre connaissance cette étude partielle de KANAMORI et MOEDA est la seule analyse chromatographique concernant la ferritine et l'apoferritine.



Fig. 26. — Chromatogramme d'un hydrolysate de ferritine.
En première dimension : butanol-acide acétique-eau.
En deuxième dimension : phénol ammoniacal.

L'arginine et l'histidine ont été dosés, par colorimétrie, directement sur l'hydrolysat selon les techniques de DUMAZERT et POGGI [50] pour l'arginine, et de JORPES [51] pour l'histidine. Le dosage de la lysine a été réalisé après adsorption des bases hexoniques sur gel de silice préparé selon FROMAGEOT et coll. [53] par dosage de l'azote total, de l'arginine et de l'histidine dans l'éluat.

ÉTUDE D'UN HYDROLYSAT D'APOFERRITINE

La fig. 26 représente un hydrolysat d'apoferritine après chromatographie en deux dimensions. Il est possible de distinguer une dizaine de taches plus ou moins individualisées, dont la plupart ont des R_F voisins dans le butanol-acétique. Les seuls renseignements donnés par ce chromatogramme sont d'orienter les recherches vers les bases hexoniques (tache n° 3) et vers les acides aminés suivants : valine, leucine, méthionine, phénylalanine, (taches 1 et 2). Les autres taches ne sont pas caractéristiques.

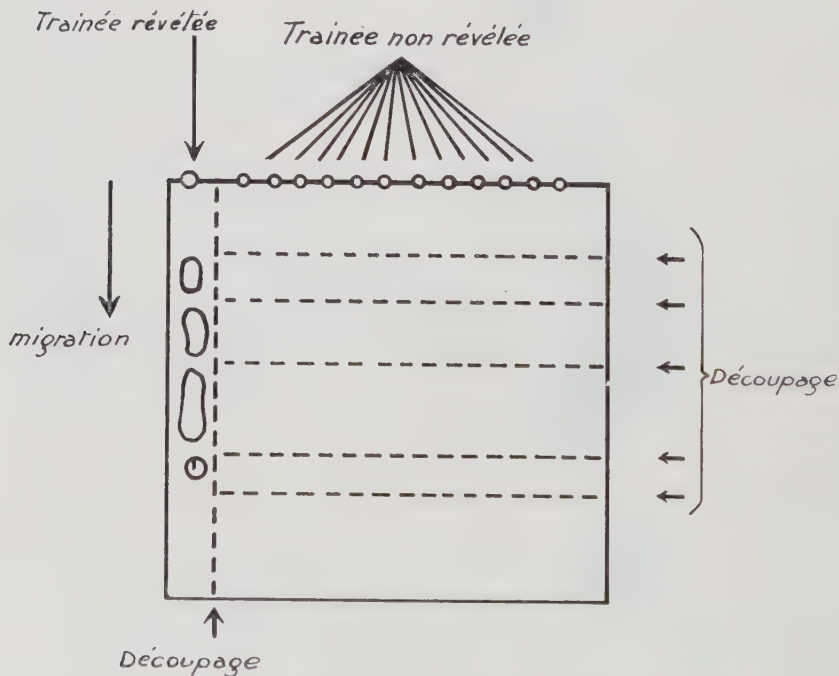


Fig. 27. — Schéma indiquant la technique utilisée pour le fractionnement de l'hydrolysat en plusieurs groupes.

Nous avons également réalisé des séparations chromatographiques en une seule dimension. Avec le phénol-ammoniacal on obtient une suite continue de taches, plus ou moins allongées et se chevauchant les unes les autres : un tel chromatogramme ne donne guère de renseignements. Par contre, avec le butanol-acétique, on distingue nettement six groupes de taches assez bien séparés les uns des autres ainsi que l'indique la fig. 28, aussi avons-nous cherché à isoler chacun de ces six groupes.

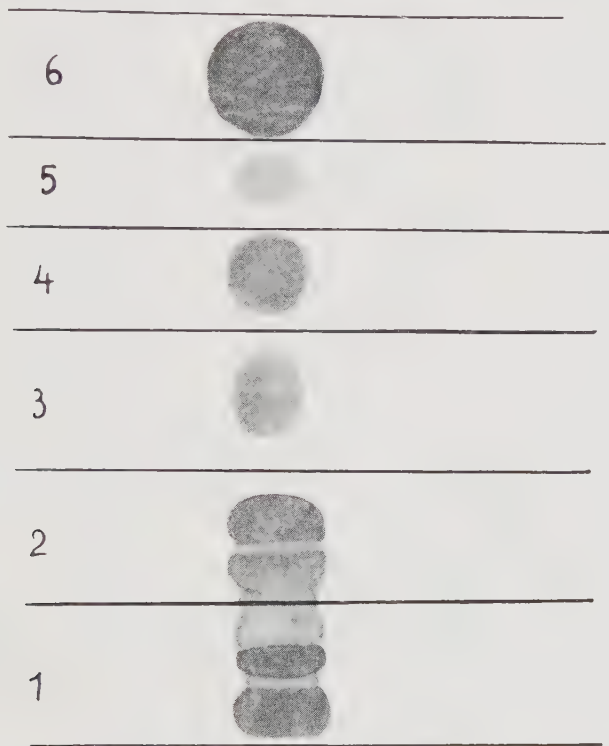


Fig. 28. — Fractionnement en 6 groupes d'un hydrolysate d'apoferritine par élution après chromatographie unidimensionnelle dans le système butanol-acide acétique-eau.

MÉTHODE DE FRACTIONNEMENT

Nous avons opéré de la façon suivante: une série de gouttes de l'hydrolysate d'apoferritine sont déposées sur une feuille de papier et chromatographiées dans le butanol-acétique. Après quoi, la trainée correspondant à la première goutte est révélée afin de nous guider dans

le découpage de la feuille en 6 bandes, correspondant chacune à un R_F moyen bien déterminé ainsi que l'indique la fig. 27; les acides aminés correspondant à chacune de ces bandes sont recueillis par élution. Après concentration, les 6 fractions ainsi obtenues sont étudiées par la méthode chromatographique.

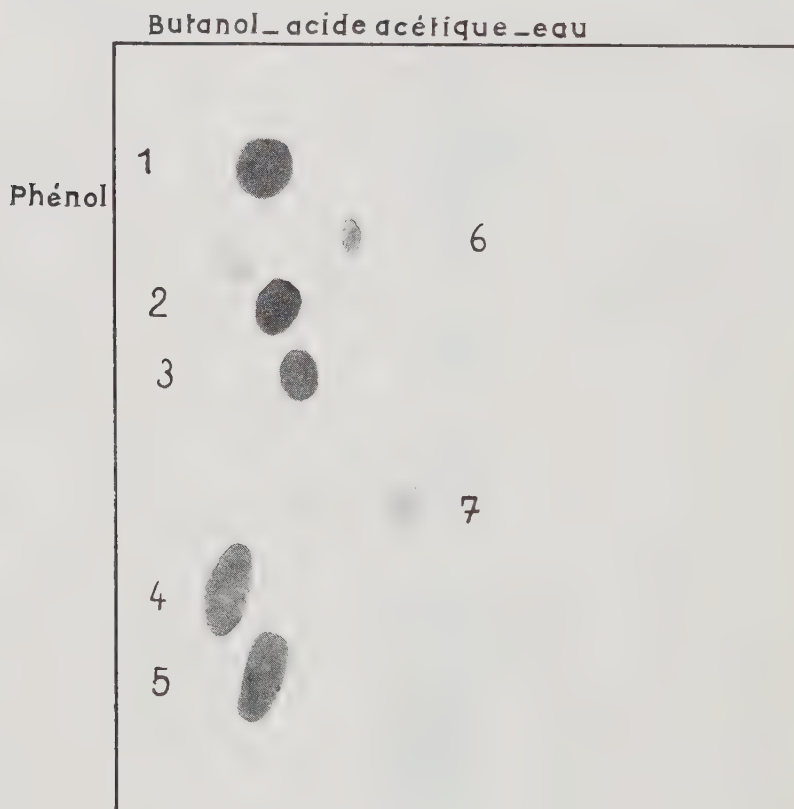


Fig. 29. — Chromatogramme de la fraction I.

ÉTUDE DE LA PREMIÈRE FRACTION

a) *Chromatographie bidimensionnelle.* Le chromatogramme de cette fraction I (fig. 29) permet de distinguer 5 taches nettes (1, 2, 3, 4 et 5) et 2 autres (6 et 7) moins intenses, de R_F plus élevé dans le butanol-acétique, et qui appartiennent vraisemblablement à la fraction II (remarquons à ce sujet que la limite entre les 2 premières fractions (fig. 28) est moins nette que les autres).

Le tableau ci-dessous donne les R_F de chacune de ces cinq taches et les R_F , déterminés dans les mêmes conditions, de l'acide aspartique, de la sérine, du glycocolle et de la lysine (témoins).

TABLEAU XXVI

Taches	R_F	
	Butanol acétique	Phénol ammoniacal
1	0,20	0,16
2	0,20	0,34
3	0,21	0,42
4	0,18	0,71
5	0,19	0,80
Acides aminés		
Acide aspartique	0,20	0,17
Sérine	0,21	0,35
Glycocolle	0,22	0,41
Lysine	0,18	0,78

Il ressort de ce tableau que les 3 premières taches correspondent à l'acide aspartique, à la sérine et au glycocolle. Les taches 4 et 5 correspondent au groupe des bases hexoniques.

b) *Caractérisation et dosage des bases hexoniques.* Les dosages de l'arginine et de l'histidine, réalisés directement sur l'hydrolysate total nous ont montré les résultats suivants : (en p. 100 de l'azote total).

arginine : 9,8 p. 100

histidine : 10,6 p. 100

La lysine a été caractérisée et dosée indirectement par la méthode suivante : le groupe des bases hexoniques est séparé par adsorption sur gel de silice : après élution, on dose l'azote total ainsi que l'arginine et l'histidine (comptées en azote) de l'éluat. La lysine est évaluée à partir de la relation :

$$\text{Azote (lysine)} = \text{Azote total} - \text{Azote (arginine + histidine)}.$$

Il suffit de connaître la quantité de l'hydrolysate total qui a traversé le gel de silice pour calculer le pourcentage en lysine de l'hydrolysate. Les chiffres obtenus, moins constants que pour l'arginine ou l'histidine, oscillent autour de 8 p. 100.

TABLEAU XXVII

	<i>Résultats personnels</i>	<i>Résultats de TRIA</i>
Arginine	9,8	11,4
Histidine	10,6	10,2
Lysine	8	8,79

Notons l'accord relatif de ces résultats avec ceux publiés par TRIA [3] :

Ainsi cette première fraction est constituée par les 6 acides aminés suivants ; acide aspartique, sérine, glycocholate, arginine, histidine et lysine.

ÉTUDE DE LA FRACTION II

La fig. 30, représentant un chromatogramme bidimensionnel

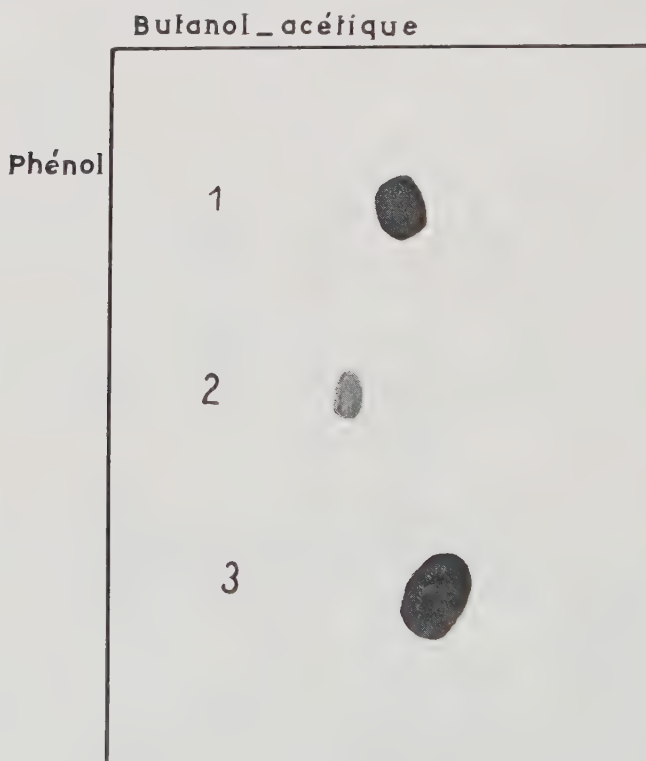


Fig. 30. — Chromatogramme de la fraction II.

de la fraction II, montre 3 taches nettes dont les R_F , ainsi que ceux de l'acide glutamique de la thréonine et de l'alanine, sont indiqués dans le tableau XXVIII.

TABLEAU XXVIII

<i>Taches</i>	<i>Butanol acétique</i>	<i>Phénol ammoniacal</i>
1	0,26	0,22
2	0,24	0,53
3	0,30	0,60
<i>Acides aminés</i>		
Acide glutamique	0,25	0,18
Thréonine	0,26	0,52
Alanine	0,31	0,60

Du reste, la fig. 31 permet de comparer directement les migrations des 3 taches de la fraction II et de ces trois acides aminés par chromatographie unidimensionnelle dans le phénol-ammoniacal.

ÉTUDE DE LA FRACTION III

Cette fraction correspond à un acide aminé unique qui se comporte chromatographiquement comme la tyrosine ainsi que l'indique la fig. 32. Nous avons, de plus, caractérisé cet acide aminé par sa courbe d'absorption dans l'ultra-violet (fig. 33), le spectre ayant été déterminé en présence de soude 0,1 N, selon FROMAGEOT [53].

ÉTUDE DES FRACTIONS IV, V ET VI

Chacune de ces fractions, reprise en deux dimensions, donne une tache unique. Les R_F correspondant à ces différentes taches et aux acides aminés suivant : méthionine, phénylalanine, leucine ont pour valeur :

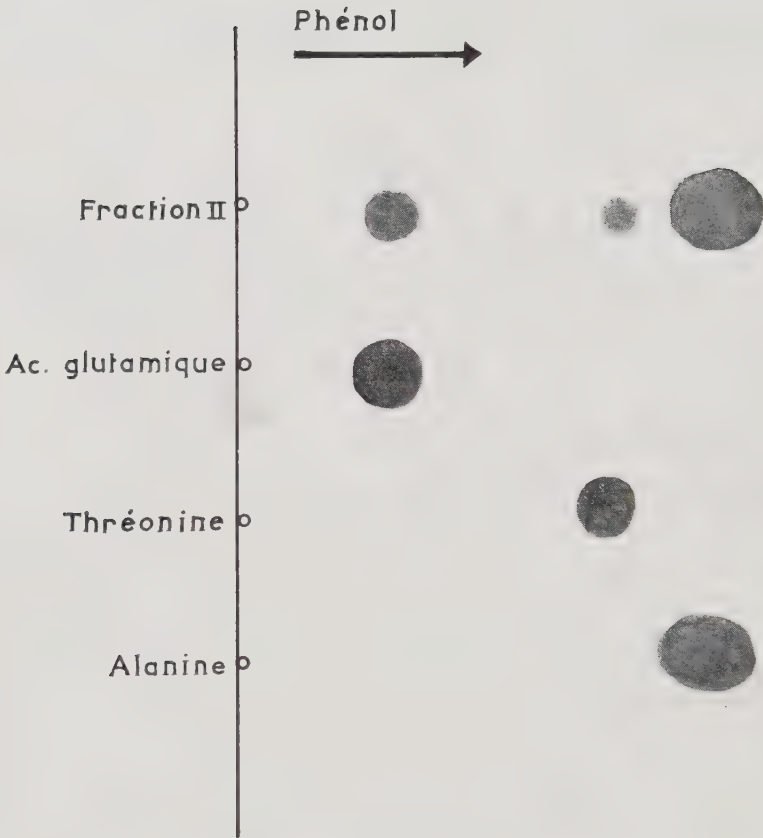


Fig. 31. — Comparaison de la fraction II de l'hydrolysate avec l'acide glutamique la thréonine et l'alanine.

TABLEAU XXIX

	<i>Butanol acétique</i>	<i>Phénol ammoniacal</i>
Fraction IV	0,50	0,78
Fraction V	0,64	0,82
Fraction VI	0,69	0,80
Méthionine	0,49	0,77
Phénylalanine	0,65	0,82
Leucine	0,70	0,80

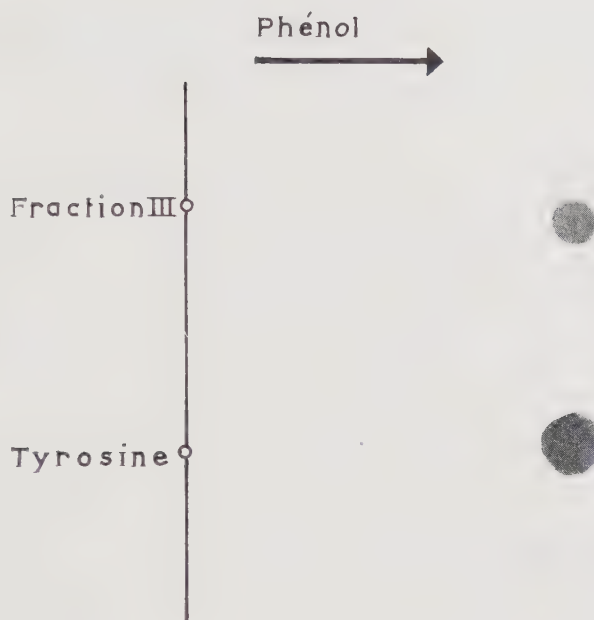


Fig. 32. — Comparaison de la fraction III de l'hydrolysate avec la tyrosine.

La fig. 34 permet la comparaison directe, après séparation chromatographique dans le phénol ammoniacal, de ces trois fractions avec la leucine, la phénylalanine et la méthionine.

CONCLUSION

Ce travail, purement qualitatif en dehors du dosage des bases hexoniques, nous a permis d'identifier les 12 acides aminés suivants : *acide aspartique, sérine, glycocolle, acide glutamique, thréonine, alanine, tyrosine, phényl-alanine, leucine, arginine, histidine et lysine.*

A cette liste il convient d'ajouter le *tryptophane* dont la présence est affirmée par GRANICK et MICHAELIS. Enfin l'identification de la fraction IV reste douteuse. En effet, cette fraction peut correspondre soit à la méthionine, soit à la valine, soit encore à ces deux acides aminés.

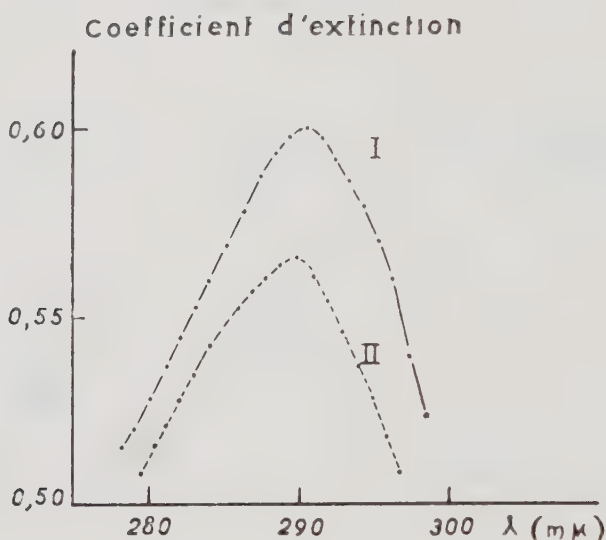


Fig. 33. — Spectre d'absorption ultra-violet de la fraction III et d'une solution de tyrosine (en présence de soude 0,1 N).

Courbe I : Tyrosine

Courbe II : Fraction III.

Deux faits retiennent notre attention :

1^o La présence de quantités non négligeables de glycocolle. Cet acide aminé, selon MAZUR, correspondrait à 4 p. 100 environ de l'apoferritine, alors qu'il est totalement absent des molécules d'ovabumine et de sérum-albumine (cheval) et en très faible proportion dans la lactalbumine, la keratine ou la caséine. Par contre, le glycocolle est en très grande quantité dans la gélatine. Peut-on penser, de ce fait, que le glycocolle joue un rôle dans l'hydratation de l'apoferritine?

2^o La grande importance des bases hexoniques qui, à elles seules, représentent environ le tiers de l'azote protéique total. On est en droit de se demander, connaissant la capacité des atomes d'azote à contracter des liaisons hydrogènes, si la formation de telles liaisons n'intervient pas dans la fixation de l'eau et du complexe minéral par la molécule d'apoferritine.

D'une façon plus générale, il est intéressant de noter la prédominance des acides aminés polaires (acide glutamique, acide aspartique, sérine etc...) susceptibles de contracter des liaisons avec les molécules polaires d'eau.

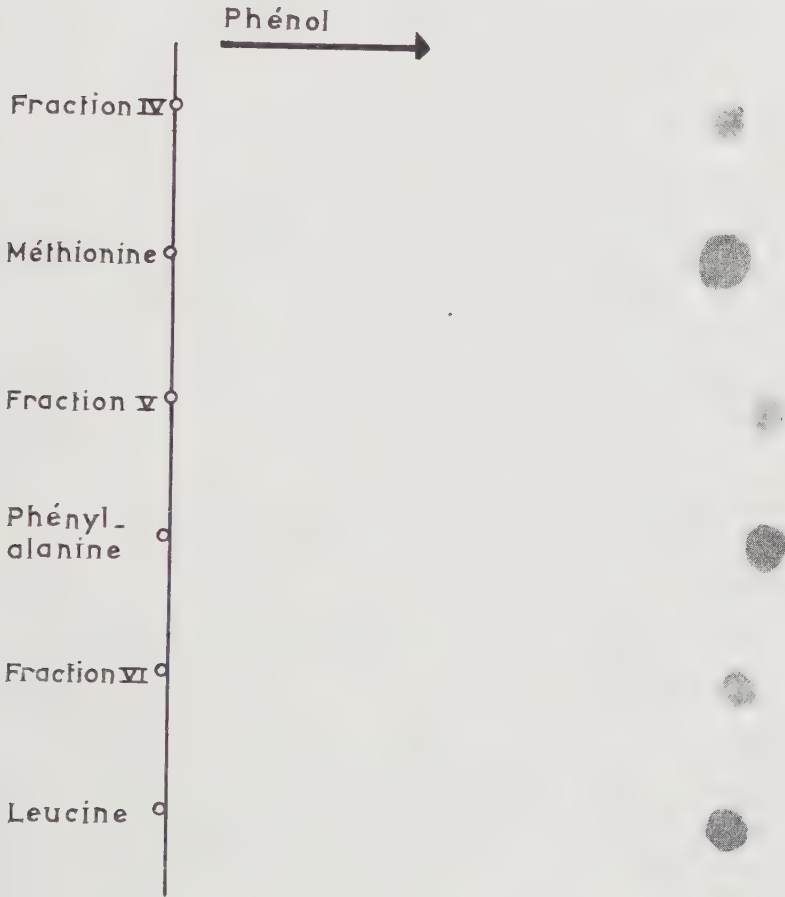


Fig. 34. — Chromatogramme des fractions IV, V, et VI de l'hydrolysate. Comparaison avec la méthionine, la phénylalanine et la leucine.

CONCLUSION

RAPPEL DES FAITS ACQUIS

1° *Le complexe minéral de la ferritine n'a pas de composition définie.*

Le rapport Fe/P varie entre deux valeurs extrêmes égales à 12 et 28, ce qui montre que le nombre de molécules d'hydroxyde ferrique par molécule de phosphate de fer oscille entre 6 et 15.

2° *La ferritine et l'apoferritine sont hétérogènes. (polydispersées).*

Il est possible de fractionner les solutions de ferritine et d'apoferritine par le sulfate d'ammonium.

L'étude osmométrique des différentes fractions de ferritine et d'apoferritine (obtenues par le sulfate d'ammonium) montre :

- a) que la molécule de ferritine est composée :
 - d'une partie protéique de masse constante = 340.500;
 - d'une partie minérale de masse variable de 0 à 181.000.

L'hétérogénéité de la ferritine dépend donc uniquement de l'inconstance de sa teneur en fer.

b) qu'une préparation donnée d'apoferritine est composée de molécules de masses différentes, les molécules les plus grosses ayant, aux erreurs expérimentales près, une masse égale à celle de la fraction protéique de la ferritine (322.000). La polydispersité de l'apoferritine est donc consécutive à l'élimination du fer.

3° *La liaison fer-protéine participe à la structure de la molécule de ferritine.*

Il est impossible de séparer le fer ferrique de la ferritine sans provoquer une dénaturation de la fraction protéique; inversement, toute dénaturation de la protéine active la libération du fer.

Par contre, il est possible de séparer, après réduction, le fer à l'état ferreux sans dénaturer la protéine. Cependant, même dans ce cas, on assiste à une fragmentation de la partie protéique. Cette fragmentation est la cause de la *polydispersité* de l'apoferritine.

4° *L'apoferritine est hydratée par rapport à la ferritine.*

En présence de sulfate d'ammonium concentré, les solutions d'apoferritine sont plus stables que les solutions de ferritine, cette différence de stabilité traduisant une différence d'hydratation.

Les solutions d'apoferritine sont nettement plus visqueuses que les solutions de ferritine. A partir des coefficients de viscosité, on peut calculer que 1 g d'apoferritine peut fixer environ 1 g d'eau d'hydratation.

L'étude de la déshydratation ménagée à température modérée des solutions de ferritine et d'apoferritine montre que 1 g d'apoferritine est capable de fixer 0,93 g d'eau d'hydratation, alors que 1 g de ferritine ne fixe qu'une très faible quantité d'eau (0,06 g par g).

5° *L'apoferritine est riche en acides aminés polaires* (susceptibles d'intervenir dans l'hydratation) et surtout en bases hexoniques qui, à elles seules, représentent 1/3 environ de l'azote total.

RÉPARTITION SPATIALE DU FER DANS LA MOLÉCULE DE FERRITINE

Nous avons vu que l'apoferritine, préparée *in vitro* par réduction, est *polydispersée*, cette polydispersité étant consécutive au départ du fer dont le rôle apparaît, par suite, comme fondamental dans l'édifice de la molécule de ferritine.

Cependant, les expériences rapportées ne permettent qu'indirectement de préciser la *répartition spatiale* du fer dans la protéine. Voici les faits qui, dans ce domaine, nous paraissent suggestifs :

1° La polydispersité de l'apoferritine consécutive à l'élimination du fer suggère que ce métal sert de lien entre des particules protéiques dont l'assemblage formerait la molécule de ferritine; le fer ne saurait donc être intégré dans ces particules elles-mêmes, mais plutôt maintenu à leur surface par des liaisons du type coordinatif telles que celles qui peuvent exister entre les chaînes latérales d'acides aminés (compte tenu de la présence, démontrée par chromatographie, en quantité relativement grande d'acides aminés polaires et notamment de bases hexoniques).

2° L'étude comparée des viscosités des solutions de ferritine et d'apoferritine conduit à admettre la solvation des molécules d'apoferritine. De plus, les conditions dans lesquelles s'effectue la déshydratation de l'apoferritine laissent penser qu'il ne s'agit pas d'eau intimement liée à la protéine (comme l'eau de cristallisation ou certaines fractions de l'eau des gels) mais d'une hydratation superficielle. Puisque l'on doit admettre que l'eau de l'apoferrine remplace le complexe minéral de la ferritine, les positions relatives de ces deux constituants par rapport à la partie protéique doivent être identiques: ceci confirme la position superficielle du fer par rapport à la protéine.

3° Nous noterons enfin que l'apoferritine peut être préparée à partir de ferritine par réduction au moyen de corps tels que la cystéine dont la molécule est, d'après GRANICK, trop grosse pour s'insinuer entre les chaînes polypeptidiques de l'apoferritine; ce qui laisse supposer que le mécanisme de la réduction du fer s'exerce à la surface des molécules de ferritine.

NOTES ANNEXES

1 — CARACTÈRES IMMUNOLOGIQUES DE LA FERRITINE
ET DE L'APOFERRITINE.

2 — RÉVÉLATION SPÉCIFIQUE SUR PAPIER DE LA
FERRITINE.

3 — pH ISOÉLECTRIQUE DE LA FERRITINE ET DE
L'APOFERRITINE

4 — MASSES SPÉCIFIQUES DE LA FERRITINE ET DE
L'APOFERRITINE

CARACTÈRES IMMUNOLOGIQUES DE LA FERRITINE ET DE L'APOFERRITINE *

Nous avons entrepris l'étude des propriétés immunochimiques de ces protéines dans le but de confirmer l'hypothèse (admise à plusieurs reprises) selon laquelle la ferritine et l'apoferritine d'une même espèce animale sont structuralement identiques.

On sait en effet, que lorsque l'on introduit dans un organisme animal une substance étrangère G (antigène), cet organisme réagit en élaborant une substance neutralisante A (anticorps). Chaque fois que A et G sont mis en présence, ils s'unissent l'un à l'autre pour former un complexe A-G (antigène-anticorps) qui précipite.

Parfois, la réaction de précipitation n'apparaît pas. C'est le cas notamment lorsque l'antigène est en excès (zone d'inhibition antigénique). C'est également le cas lorsque le complexe reste soluble en présence d'un excès d'anticorps. Au contraire, la réaction de précipitation est maximum lorsque la proportion d'antigène et d'anticorps a une valeur bien déterminée : on est alors au point d'équivalence.

La réaction antigène-anticorps est spécifique, au point qu'elle permet de différencier deux antigènes (deux protéines par exemple) de compositions et de structures si voisines qu'aucune autre méthode ne permet de les distinguer : on admet généralement (LANDSTEINER) que les configurations superficielles de l'antigène et de l'anticorps sont complémentaires, c'est-à-dire que le complexe antigène-anticorps ne se forme que lorsque le site réactionnel de l'anticorps peut se mouler géométriquement sur celui de l'antigène.

(*) Je remercie le Professeur agrégé ROUX, du Laboratoire Microbiologique de la Faculté de Médecine de Montpellier, et ses collaborateurs, qui ont permis la réalisation de ces techniques immuno-chimiques.

De telle sorte que la spécificité de la réaction antigène-anticorps est étroitement liée à la structure secondaire superficielle de l'antigène : lorsque deux antigènes se comportent identiquement vis-à-vis d'un même anticorps, on peut admettre leur identité structurale.

C'est une telle identité que nous allons essayer de mettre en évidence en ce qui concerne la ferritine et l'apoferritine d'une même espèce animale (cheval en particulier).

DONNÉES EXPÉRIMENTALES

I. — PRÉPARATION D'UN IMMUN-SÉRUM.

Nous avons préparé un sérum antiferritine de cheval en injectant en 4 fois, à un lapin, des quantités de ferritine de cheval purifiée respectivement égales à 10-20-30 et 40 mg. Le rapport Fe/N de l'échantillon utilisé est égal à 2,1.

Une semaine après la dernière injection, le lapin est saigné et le sérum recueilli.

II. — RÉSULTAT OBTENUS.

Nous indiquons ici les résultats que nous avons obtenus par la méthode de diffusion de l'antigène et de l'anticorps en milieu gélifié dans les boîtes d'Outcherlony.

a) Détermination du point d'équivalence.

Au centre de la boîte, on dispose 0,1 ml d'une solution pure de ferritine de cheval contenant 4 mg/ml. A la périphérie, comme l'indique la fig. 35, on dispose le sérum de lapin antiferritine de cheval à différentes

dilutions, 1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{20}$, $\frac{1}{50}$.

Après trois jours à l'étuve à 37° on observe une ligne de précipitation maximum pour la dilution $\frac{1}{2}$ de l'anticorps, dilution qui correspond donc au point d'équivalence.

b) Essai de réactions croisées.

En respectant les conditions de concentration que nous venons de préciser, nous avons cherché à réaliser des réactions croisées entre le sérum antiferritine de cheval d'une part, l'apoferritine de cheval et la ferritine de chien d'autre part. Nous avons opéré de la façon suivante (fig. 36) :

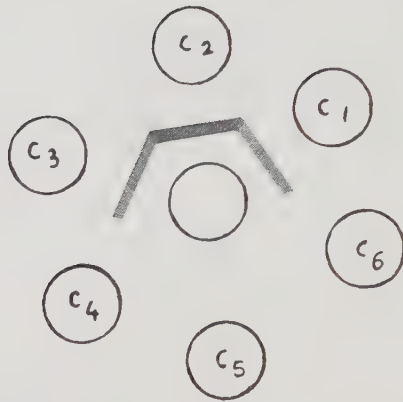


Fig. 35. — Détermination du point d'équivalence.

Au centre : ferritine de cheval

Périphérie : sérum antiferritine de cheval.

(dilutions : 1-1/2-1/4-1/10-1/20-1/50).

Au centre de la boîte : Sérum antiferritine de cheval.

A la périphérie : Apoferritine de cheval en 4
Ferritine de cheval en 2, 3 et 5
Ferritine de chien en 1

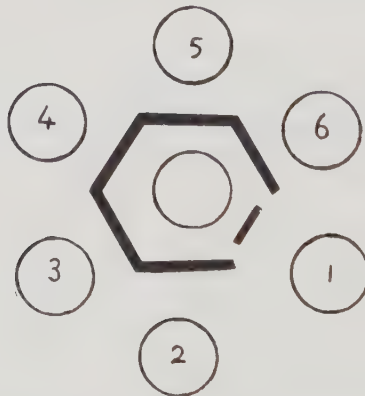


Fig. 36. — Réactions croisées entre ferritine de cheval (2-3-5-6), apoferritine de cheval (4) et ferritine de chien (1).

Au centre : sérum antiferritine de cheval.

Noter l'identité des lignes de précipitation 2-3-4-5 et 6.

On constate que les lignes de précipitation correspondant à 2, 3, 4, 5 et 6, c'est-à-dire à la ferritine et à l'apoferritine de cheval, sont identiques entre elles.

La ligne de précipitation 1, correspondant à la ferritine de chien, indique une réaction croisée entre la ferritine de chien et le sérum antiferritine de cheval. Mais cette réaction n'a pas les mêmes caractères que pour la ferritine ou l'apoferritine de cheval. Cela ressort encore mieux de la fig. 37 qui représente une expérience analogue où :

1 et 4 correspondent à de la ferritine de chien.

2, 3, 5, 6 à de la ferritine de cheval.

les lignes de précipitation 1 et 4 sont beaucoup plus faibles que les autres et leurs positions sont également différentes.

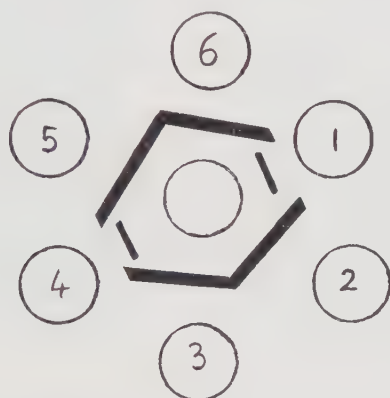


Fig. 37. — Réactions croisées.

Au centre : sérum antiferritine de cheval.

Périphérie : ferritine de cheval (2-3-5 et 6).
ferritine de chien (1 et 4).

Notons que la ferritine de chien et de cheval ont en commun la forme de leurs cristaux, la constante de sédimentation, le pH isoélectrique etc... Ceci objective bien ce que nous disions précédemment sur la spécificité de la réaction antigène-anticorps qui n'est que partielle pour deux protéines aussi peu différentes que les ferritines de cheval et de chien : cela montre une différence certaine de leurs structures.

Par contre, l'identité de comportement de la ferritine et de l'apoferritine de cheval vis-à-vis du sérum antiferritine de cheval suggère que les structures de ces deux protéines sont semblables. (*)

(*) — Quelques travaux ont été consacrés au comportement immunologique de la ferritine. Signalons ceux de GRANICK qui a pu, par ce procédé, prouver que les ferritines issues de différents organes d'un même animal sont identiques entre elles ainsi que la ferritine et l'apoferritine. De même les travaux de MAZUR et SHORR qui ont essentiellement appliqué la méthode immunologique à l'identification de la ferritine au « V.D.M. » ou vasodilatator matériel d'origine hépatique et responsable, selon ces auteurs, de l'état de choc. Ces auteurs ont également réalisé des réactions croisées entre ferritine de chien et ferritine de cheval.

II

RÉVÉLATION SPÉCIFIQUE SUR PAPIER DE LA FERRITINE

L'étude de la migration électrophorétique de la ferritine nous a amené à rechercher de quelle façon cette substance peut être mise en évidence sur papier. Nous avons évidemment recherché une méthode basée sur la présence de fer, ce qui a l'avantage de constituer une réaction relativement spécifique, notamment lorsque la ferritine se trouve mélangée à d'autres protéines (sérum par exemple).

La réaction au sulfocyanure ne nous a pas donné des résultats satisfaisants. Après divers tâtonnements, nous avons adopté le mode opératoire suivant, qui nous a donné d'excellents résultats pour la révélation des diagrammes d'électrophorèse de ferritine :

Sur une feuille de papier chromatographie-électrophorèse, on dépose une goutte de solution d'une ferritine de concentration telle qu'un ml contienne approximativement 0,05 mg. de fer, soit une concentration de ferritine de 0,25 g par litre. La réaction est d'ailleurs franchement positive avec des concentrations deux fois plus faibles. La goutte est séchée à l'étuve à 80°, le papier est ensuite plongé quelques secondes dans une solution à 2 p. 100 de ferrocyanure de potassium, puis dans une solution bouillante constituée d'un mélange à parties égales de :

Acide chlorhydrique N,
Acide trichloracétique à 10 p. 100

Il apparaît aussitôt une intense coloration bleue. On lave abondamment à l'eau et on sèche. Nous avons adopté le mélange acide ci-dessus qui réalise à la fois la floculation de la protéine et la libération du fer.

Il est essentiel, pour obtenir de bons résultats, de débarrasser le papier utilisé de la faible quantité de fer qu'il contient et qui se traduit par une teinte légèrement bleutée de toute sa surface après traitement

au ferrocyanure. Pour cela, il suffit d'immerger préalablement les feuilles de papier dans une solution d'acide chlorhydrique à 5 p. 100 pendant douze heures, de laver et de sécher. Les photographies (fig. 38) montrent les résultats obtenus.

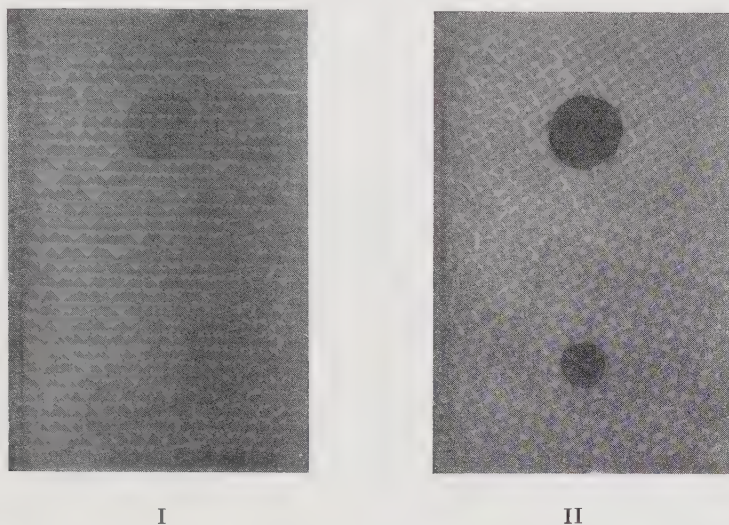


Fig. 38. — Les taches de la photographie I correspondent à de la ferritine non révélée. Les taches de la photographie II sont révélées par une solution de ferrocyanure de potassium en milieu acide.

Les taches supérieures correspondent à 2 mm³ d'une solution de ferritine contenant environ 3 mg de fer par ml. Les taches inférieures correspondent à 2 mm³ d'une solution de ferritine contenant environ 0,05 mg de fer par ml. Dans ces conditions la tache inférieure de la photographie I n'est pas visible. La teinte extrêmement pâle de la tache supérieure est due à la coloration propre de la solution de ferritine.

III

DÉTERMINATION DU pH ISOELECTRIQUE DE LA FERRITINE

Nous avons effectué cette détermination par l'étude de la variation de la migration électrophorétique (électrophorèse sur papier) de la ferritine en fonction du pH.

Nous avons utilisé les tampons suivants :

Tampon au véronal de DURRUM pH = 8,6
Tampons phosphates pH = 6 et 5
Tampon acétate pH = 4,4

Au cours de chacune des mesures, le flux d'électro-osmose est mesuré par la migration d'un témoin (dextran). Dans tous les cas le temps de migration a été de 3 heures.

Les mobilités sont trouvées égales à :

<i>pH</i>	<i>Mobilités</i>
8,6	$0,13 \cdot 10^{-5}$
6	$0,092 \cdot 10^{-5}$
5	$0,045 \cdot 10^{-5}$
4,4	$0,005 \cdot 10^{-5}$

Par extrapolation de la courbe représentative des mobilités en fonction du pH, on trouve que la mobilité nulle correspond sensiblement à un pH égal à 4,3 (graphique 39).

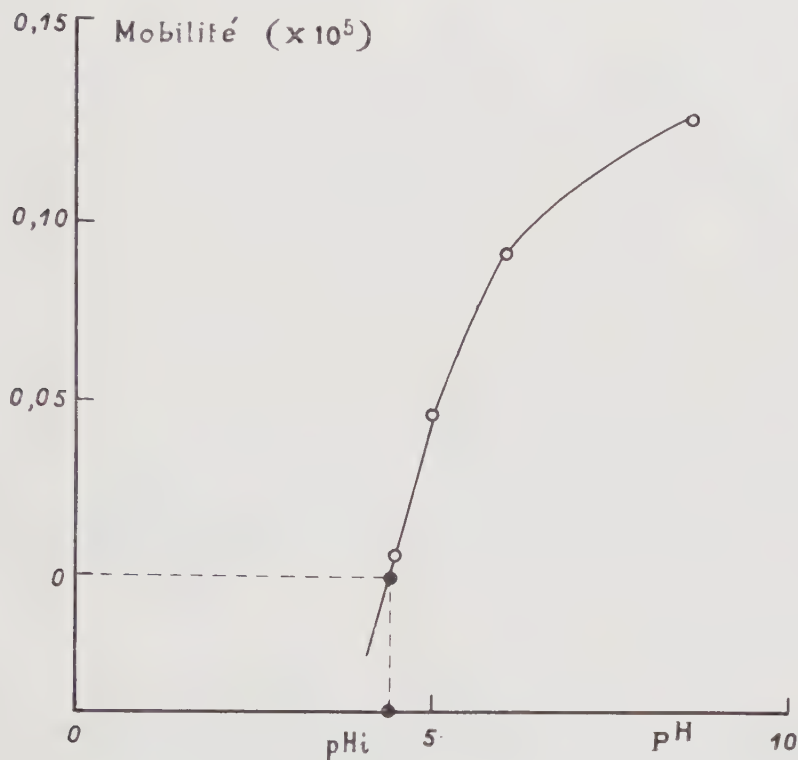


Fig. 39. — Variation de la mobilité électrophorétique de la ferritine en fonction du pH. Détermination du pH isoélectrique.

La ferritine et l'apoferritine se comportant d'une façon identique à l'électrophorèse, ce pH = 4,3 est aussi le pHi de l'apoferritine.

IV

MESURE DE LA MASSE SPÉCIFIQUE DE LA FERRITINE - VARIATION EN FONCTION DE LA TENEUR EN FER

Nous avons réalisé cette mesure par la méthode suivante : un volume V connu (mesuré avec une pipette de précision) d'une solution de ferritine pure est desséchée à l'étuve jusqu'à poids constant. Le volume V' de l'eau contenue dans les V ml de la solution se déduit facilement de la masse d'eau évaporée. Le volume v occupé par la protéine anhydre est égal à : $v = V - V'$. En appelant m la masse du résidu sec, la masse

spécifique est égale à : $\rho = \frac{m}{v}$

En raison de l'inconstance de la teneur en fer de la ferritine on ne peut pas définir une masse spécifique unique, mais seulement, pour chaque échantillon, une masse spécifique moyenne. Chaque échantillon étant caractérisé par sa teneur en fer, les mesures montrent que :

V	V'	m	ρ	<i>Fer p. 100</i>
4,995	4,941	0,094	1,741	23
4,995	4,929	0,110	1,662	18
4,995	4,932	0,097	1,554	12
4,995	4,917	0,105	1,346	0

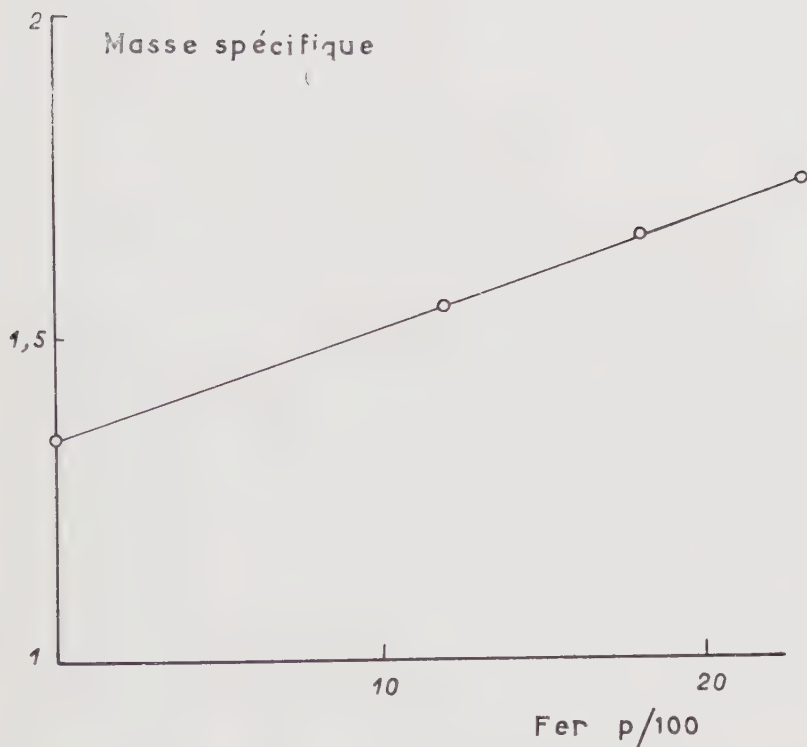


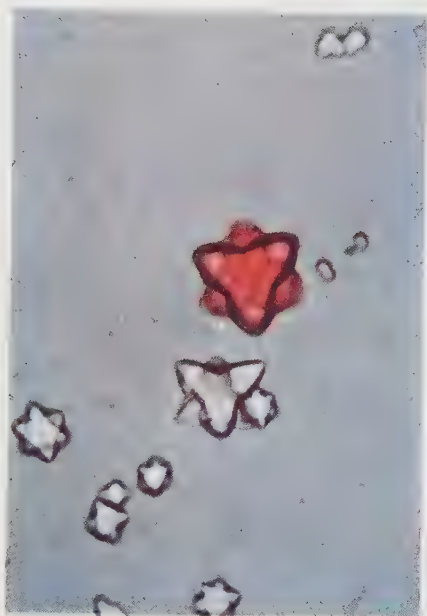
Fig. 40. — Variation de la masse spécifique de la ferritine en fonction de la teneur en fer:

D'où le graphique 40 représentant les variations de ρ en fonction de la teneur en fer. Ce sont les valeurs déterminées à partir de ce graphique que nous avons fait intervenir pour le calcul de l'hydratation de l'apoferritine à partir des mesures de viscosité.

BIBLIOGRAPHIE

17. ARCHIBALD (R.M.), cité par MICHAELIS. — *Adv. Prot. Chem.*, 1947, **3**, 53.
21. BAEZ (S.), MAZUR (A.) et SHORR (E.). — *Fédération Proc.*, 1948, **7**, 5; 1949 **8**, 7.
35. BÉNÉZECH (Ch.) et MAGNAN DE BORNIER (B.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1955, **149**, 774.
40. BÉNÉZECH (Ch.) et MAGNAN DE BORNIER (B.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1956, **150**, 1555.
43. BÉNÉZECH (Ch.) et MAGNAN DE BORNIER (B.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957 (à paraître).
44. BÉNÉZECH (Ch.), LLORY (J.) et MAGNAN DE BORNIER (B.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1955, **149**, 1608.
23. CROWFOOT HODGKIN. — *Symposium Quant. Biol.*, 1949, **14**, 65.
50. DUMAZERT (C.) et POGGI. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1939, **21**, 1381.
47. EINSTEIN (A.). — *Ann. des Physik*, 1906, **19**, 289; 1911, **34**, 591.
33. FARRANT (J.-L.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1954, **13**, 569.
12. FRANCKUCHEN (I.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, **10**, 57.
52. FROMAGEOT (Cl.). JUTISZ (H.) et LEDERER (E.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1948, **2**, 487.
53. FROMAGEOT (Cl.) et SCHNECK (G.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1950, **6**, 114.
8. GRANICK (S.). — *J. Biol. Chem.*, 1942, **146**, 451.
11. GRANICK (S.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, **149**, 157.
16. GRANICK (S.). — *Chem. Rev.*, 1946, **38**, 379.
19. GRANICK (S.). — *Ann. N.Y. Acad. Soc.*, 1947, **48**, 657.
26. GRANICK (S.). — *Physiol. Rev.*, 1951, **31**, 440.
15. GRANICK (S.) et HAHN (P.-F.). — *J. Biol. Chem.*, 1944, **155**, 661.
9. GRANICK (S.) et MICHAELIS (L.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, **417**, 91.
13. HAHN (P.-F.), GRANICK (S.), BALE et MICHAELIS (L.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, **150**, 407.
30. HEILMEYER (L.), WOHLER (F.) et KEIDERLING (W.). — *Acta Haematol.*, 1954, **12**, 154.
49. HENDERSON et SNELL. — *J. Biol. Chem.*, 1948, **172**, 15.
5. INNES MC. — *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 1942, **43**, 175.
51. JORPES (E.). — *Biochem. J.*, 1932, **26**, 1507.
31. KANAMORI (M.) et MOEDA (I.). — *J. Agric. Chem. Soc. Jap.*, 1954, **28**, 692.
4. KUHN (R.), SORENSEN (M.-A.) et BIRKOFER (L.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1940, **73 B**, 823.
1. LAUFBERGER (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1937, **19**, 1575.
46. LABAW (L.) et WYCKOFF (R.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, **25**, 263.
18. MICHAELIS (L.). — *Adv. in Prot. Chem.*, 1947, **3**, 53.
10. MICHAELIS (L.), CORYELL (Ch.-D.) et GRANICK (S.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, **148**, 463.
7. MICHAELIS (L.) et GRANICK (S.). — *Science*, 1942, **95**, 439.
20. MAZUR (A.) et SHORR (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1948, **178**, 771.
22. MAZUR (A.) et SHORR (E.). — *Federation Proc.*, 1949, **8**, 228.
24. MAZUR (A.) et SHORR (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1950, **182**, 607.
37. MAZUR (A.) et SHORR (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1956, **220**, 80.
36. MAZUR (A.) et SHORR (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1956, **220**, 237.

34. MAZUR (A.), BAEZ (S.) et SHORR (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1955, **215**, 147.
25. MAZUR (A.), LITT (I.) et SHORR (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1950, **187**, 473.
41. MAGNAN DE BORNIER (B.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, **39**, 1067.
45. MAGNAN DE BORNIER (B.) et BÉNÉZECH (Ch.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, **37**, 363.
42. MACABIES (J.), MAGNAN DE BORNIER (B.) et ORSETTI (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1956, **150**, 2244.
55. NICLOUX (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1942, **24**, 1001; 1943, **25**, 1046.
29. RENDI (R.). — *Bull. Soc. Ital. Biol. Sp.*, 1954, **30**, 508.
56. ROCHE (A.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1935, **17**, 704.
6. ROTHEN (A.). — *Ann. N.Y. Accad. Sc.*, 1943, **43**, 229.
14. ROTHEN (A.). — *J. Biol. Chem.*, 1944, **152**, 679.
38. SALTMAN, FISKIN et BELLENGER. — *J. Biol. Chem.*, 1956, **220**, 741.
2. SCHMIEDEBERG (O.). — *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 1894, **33**, 101.
28. SHODEN (A.), GABRIO (B.W.) et FINCH (C.A.). — *J. Biol. Chem.*, 1953, **204**, 823.
54. SPONSLER (O.-L.), BATH (J.-D.) et ELLIS (J.-W.). — *J. Physik. Chem.*, 1940, **44**, 996.
48. STAUDINGER (H.) et HUSEMAN (E.). — *Ber. Chem. Ges.*, 1935, **68**, 1691.
32. TAKAO, NAKAMURA et KUNIOKONNO. — *J. Biol. Chem.*, 1954, **12**, 49.
27. TECCE (G.) et TEDESCHI (G.). — *Bull. Soc. Ital. Biol. Sp.*, 1952, **28**, 1391.
3. TRIA (E.). — *Atti Accad. Ital.*, 1940, **1**, 579.



Microphotographie de cristaux de Ferritine et d'Apo ferritine

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS	9
INTRODUCTION	11
<i>Chapitre I. — PRÉPARATION ET PURIFICATION DE LA FERRITINE ET DE L'APOFERRITINE. COMPOSITION DU COMPLEXE MINÉRAL</i>	15
— Préparation de la ferritine	15
— Préparation de l'apoferritine	16
— Critères de pureté	19
— Teneur en fer de la ferritine	20
— Le complexe minéral de la ferritine	21
<i>Chapitre II. — LABILITÉ DU FER DE LA FERRITINE</i>	27
— Dosage du fer en présence de ferritine	29
— Libération du fer par les acides	32
— Libération du fer et floculation de la ferritine	36
— Action de la soude sur la ferritine	44
— Action des réducteurs sur la ferritine	45
<i>Chapitre III. — HYDRATATION DE L'APOFERRITINE</i>	47
— Stabilité des solutions de ferritine et d'apoferritine	49
— Pression osmotique	55
— Viscosité	63
Déshydratation par la chaleur	71
<i>Chapitre IV. — ÉTUDE CHROMATOGRAPHIQUE D'HYDROLISATS D'APOFERRITINE</i>	85
<i>Conclusions</i>	98
NOTES ANNEXES	101
1. Caractères immunologiques de la ferritine et de l'apoferritine	102
2. Révélation spécifique sur papier de la ferritine	106
3. Détermination du pH isoélectrique de la ferritine	108
4. Masse spécifique de la ferritine	110
<i>Bibliographie</i>	113

CAUSSE
GRAILLE
CASTELNAU
— IMPRIMEURS —
MONTPELLIER

IMPRIMERIE
CAUSSE, GRAILLE, CASTELNAU
MONTPELLIER